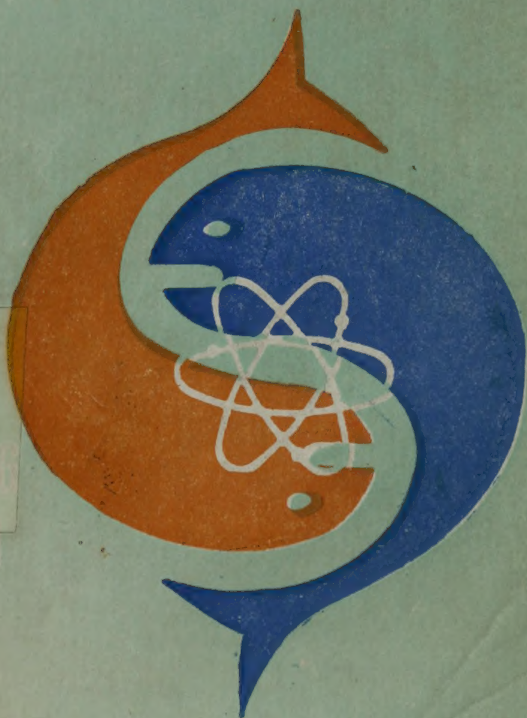
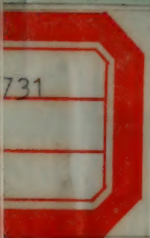
核技术在生物学中应用实验

中山大学生物系同位素研究室 编

原子能出版社





U ZAI
...WUXUEZHONG
...ONG SHIYAN

核技术在生物学中应用实验

中山大学生物系同位素研究室　编



原子能出版社



内 容 简 介

本书共有32个实验，包括核物理技术及生物学示踪技术两部分，前者侧重于测量仪器及测量技术，后者涉及动、植物的整体、器官、细胞乃至分子水平的示踪技术方法。

本书可作为大专院校的本科生、研究生及专业训练班核技术应用课程的实验指导，也可供从事核技术应用的科技人员参考。

核技术在生物学中应用实验

中山大学生物系同位素研究室 编

原子能出版社出版

（北京2108箱）

原子能出版社印刷厂印刷

新华书店总店科技发行所发行·新华书店经售

☆

开本787×1092 1/32 · 印张4 · 字数85千字

1988年 8月北京第一版 · 1988年 8月北京第一次印刷

印数1—1200

统一书号：15175·901　　定价：1.30元

ISBN 7-5022-0047-9/TL·17

编者的话

核技术在生物学的各个领域中越来越广泛地得到应用，已成为现代生物学的不可缺少的实验手段之一。为适应我国原子能在生物学、农业科学等方面的科研、教学发展需要，我们根据多年的教学科研及专业培训班工作经验，参考了国内外有关资料，编写了这本《核技术在生物学中应用实验》。

本书中核物理技术由李藻发负责编写。生物学示踪技术由陈舜华、刘振声、林丽宽、方恩明、丘泉发等负责编写。由于我们水平有限，错误之处在所难免，欢迎大家在使用过程中，对本书提出批评指正。

本书编写过程中得到蒲蛰龙教授的热情鼓励和支持，特此致谢。

编者　1985年1月

目　录

实验一　G-M计数器坪特性的测定

一、实验目的

1. 了解用G-M计数器测量放射性的基本装置；
2. 测量G-M计数管坪特性，决定计数管的工作电压；
3. 研究坪特性与测量设备的条件有何关系。

二、基本原理

G-M计数器是利用气体电离放电来记录射线粒子数的仪器，它主要由圆柱型或钟罩型计数管、前置放大器及定标器等组成，如图 1-1 所示。

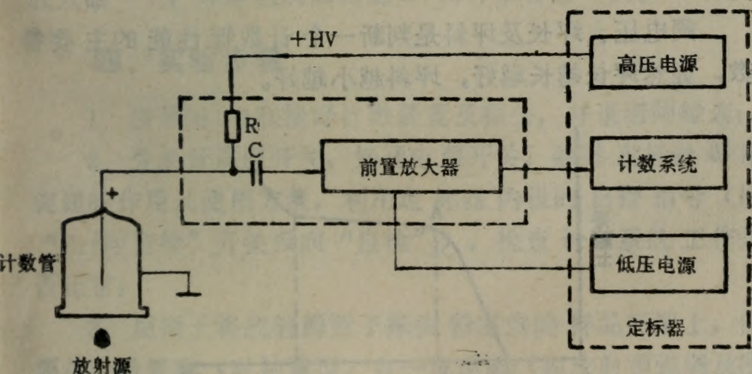


图1-1　G-M计数器结构框图

G-M计数管工作于气体电离电流-电压曲线的G-M区。当放射源强度不变时，计数率随外加高压变化有如图 1-2 所示的特性，称为“坪”特性。可以看出，当高压太低时，测不到计数；当高压增至V_s后，开始有计数，但计数率很低，V_s 称为计数管的阈电压；当高压再继续增大时，计数率迅速增加；当高压增至 V_A以后直至 V_B，在这段高压范围内，计数率基本上不随高压而改变或改变不大，此段曲线A B称为计数管的“坪”，(V_B-V_A) 称为坪长，坪的斜率可用下式表示：

$$坪斜 = \frac{N_B - N_A}{(N_B + N_A)/2} \Big/ (V_B - V_A) \qquad (1\text{-}1)$$

坪斜的单位为每 100 V 或每V增加的百分计数率；当高压由V_B 再继续增高时，计数率却急剧增加，这是由于管内淬灭气体逐渐失去其淬灭作用，而使管内发生了连续放电的结果。计数管连续放电会大大缩短计数管的寿命，使用中应避免。

阈电压、坪长及坪斜是判断一个计数管性能的主要参数，显然坪长越长越好，坪斜越小越好。

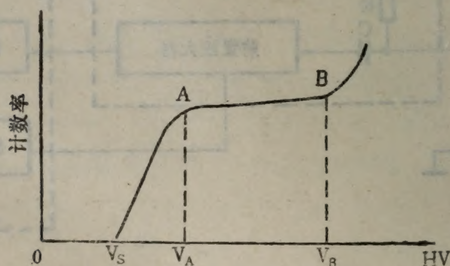


图1-2 G-M计数管特性曲线

为使测量稳定及计数管安全，计数管的工作电压V_w最好按下式选定：

$$[V_A+(V_B-V_A)/3]\leqslant V_w\leqslant[V_A+(V_B-V_A)/2] \tag{1-2}$$

计数管工作一段时间后，坪特性会改变，所以必须定期地（一般为一个月）重新确定其工作电压数值。

坪的宽度在某种程度上决定于计数管的负载，如果负载不同，例如换接另一探头，则需要重新测定其坪曲线，并选择其工作电压。

计数管一般应置于铅屏蔽内，以降低其本底计数率。

前置放大器主要是起阻抗变换作用，并能把计数管输出的微小脉冲信号放大到足以为计数装置所检测。

三、主要材料及仪器

1．放射源：$^{90}Sr-^{90}Y$标准源或其他放射源；

2．仪器：FH-408型或其他型号自动定标器一台，前置放大器一个，钟罩型及圆柱型G-M计数管各一支。

四、实验步骤

1．按照图1-1联接好计数装置及探头，并请老师检查；

2．先断开高压开关，接通电源开关，熟悉定标器等各旋钮的作用及使用方法，利用定标器内设的自检信号（把“工作/自检”开关扳向“自检”），检查计数系统工作是否正常；

3．用摄子将放射源置于探头铅室内的样品托架上，使源与计数管窗（对钟罩型）有一定距离（视放射源强弱及所要求的探测效率等因素来确定，一般在2cm左右为宜）；

4．将高压调节旋钮向左旋至最小，开启高压电源，使计数器处于"工作"状态，将甄别阈调节旋钮调至某一适当位置（不能置于太低，否则极易受到其他电器的干扰，造成假计数；也不能置于太高，以免待测信号无法通过，造成无计数。一般可置于中间位置），缓慢增加高压直至定标器开始有计数，此时的高压值即为V_0。此后可每升高40V或50V就取一次计数率读数，每次计数时间视放射源强度而定，一般可为30 s或60s。测到坪区后，若发现计数率有较大的突增时，应立即降低高压，以免损坏计数管。将以上结果记入表1-1；

5．改变条件（如放大倍数及甄别阈等）再测量高压与计数率的关系，将结果记入表1-1。

五、结果及分析

表1-1　高压与计数率的关系

高压（V）									
β计数率(cpm) / 本底(cpm)	条件1								
	条件2								
	条件3								
	条件4								

注：条件1：

条件2：

条件3：

条件4：

1．根据表1-1画出不同条件下的坪特性，指出坪宽，求出坪斜；

2．试比较分析四条坪特性，找出最佳条件及确定计数

管的最佳工作电压。

六、主要参考资料

[1] Wang, C.H.et al., Radiotracer Methodology in the Biological Environmental, and Physical Sciences. 96—121, PRENTICE-HALL, INC. Englewood Clffs. New Jersey, 1975.

实验二　相对放射性的测量及漏计数的校正

一、实验目的

1．掌握实验数据误差处理的基本方法；

2．掌握G-M计数器分辨时间的测定法及漏计数的校正法。

二、基本原理

1．由于放射性衰变是一种统计过程，射线与探测器相互作用而被探测到的过程也是随机的，所以对测量的结果必须经过统计学的处理或叫测量数据的误差处理，以便在可以接受的误差范围内，估算测量结果的真值。

根据统计学理论，对某一放射源来说，进行m次测量，其值可用m次测得值的算术平均值$\bar{n}$来表示，即

$$\bar{n} = \frac{n_1 + n^2 + \cdots + n_m}{m} = \sum_{i=1}^{m} n_i/m \qquad (2\text{-}1)$$

式中 n_i——第 i 次测量所得的计数率，i = 1，2，3，……

m_0。

为了表示变量值围绕平均值的离散程度，引入标准偏差σ_n，且

$$\sigma_n=\sqrt{\sum_{i=1}^{m}(n_i-\bar{n})^2/(m-1)} \qquad (2\text{-}2)$$

它表示在某一次测量中，有68.3%的计数值可能落在（$\bar{n}+\sigma_n$）和（$\bar{n}-\sigma_n$）之间，或有95.45%的值落在$\bar{n}\pm2\sigma_n$之间，或有99.70%的值落在$\bar{n}\pm3\sigma_n$之间。

因此，测量结果可用下式表示：

$$n=\bar{n}\pm\sigma_n \qquad (2\text{-}3)$$

为了比较各个测量的精确程度，引入相对标准偏差E，且

$$E=\frac{\sigma_n}{\bar{n}}\times100\% \qquad (2\text{-}4)$$

当$\lambda t\ll1$（即测量时间t≪半衰期）时，可以证明：

$$\sigma_n\approx\sqrt{\bar{n}} \qquad (2\text{-}5)$$

当n比较大，即$\bar{n}-n\ll n$时，

$$\sigma_n\approx\sqrt{(\bar{n}-n)+n}\approx\sqrt{\bar{n}} \qquad (2\text{-}6)$$

计数率I的标准偏差为

$$\sigma_I=\frac{\sqrt{\bar{n}}}{t}=\sqrt{\frac{I}{t}} \qquad (2\text{-}7)$$

在放射性测量中，总是存在本底计数率，设在t_b时间内测得本底计数率为I_b，在t_{s+b}时间内测得放射源的计数率为I_{s+b}，则样品的标准偏差为

$$\sigma_s = \sqrt{\frac{I_{s+b}}{t_{s+b}} + \frac{I_b}{t_b}} \tag{2-8}$$

最后的结果可表示为

$$I_s = (I_{s+b} - I_b) \pm \sqrt{\frac{I_{s+b}}{t_{s+b}} + \frac{I_b}{t_b}} \tag{2-9}$$

2．当用G-M计数器来测量放射性时，由于G-M计数管内气体电离后形成的正离子鞘，在到达阴极前的某一时间τ_d内，随后进入计数管的带电粒子，在空间电荷电场影响下，不能引起气体放电，因而不能被记录，此段时间τ_d称为G-M计数管的死时间；在τ_d以后的一定时间τ_R内，进入G-M计数管的带电粒子又能产生气体放电，但输出脉冲幅度只能从很小逐渐恢复到正常值，见图2-1，τ_R称为G-M管的复原时间；由于计数器灵敏度的限制，一般只能记录在时间τ以后出现的脉冲，τ称为计数器的分辨时间。若计数器的灵敏度足够高的话，则$\tau \approx \tau_d$。

显然，若τ愈大，或计数率愈高，漏记录的粒子数就愈多。因此，在分辨时间比较大及计数率比较高的情况下，必

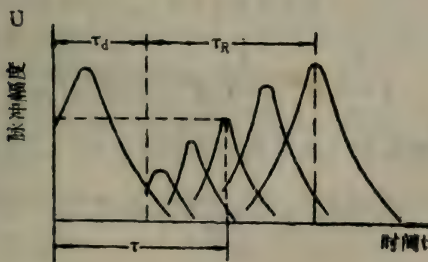


图2-1　G-M计数器的输出脉冲波形

须对实测结果进行漏记录数的校正，才能得到真正进入计数管的粒子数N_0，且有如下的关系式：

$$N_0 - N = \frac{N_0}{t} \cdot N\tau \qquad (2\text{-}10)$$

即

$$N_0 = \frac{N}{1 - \frac{N}{t} \cdot \tau} \qquad (2\text{-}11)$$

或

$$I_0 = \frac{I}{1 - I\tau} \qquad (2\text{-}12)$$

式中N为在t时间内测得的计数；I为测得的计数率；I_0为真正的计数率。

需要注意的是，公式（2-12）是一种近似方程，仅适用于0—10%范围内的校正。

分辨时间τ的确定，可以用双源法，也可以用示波器法等。

双源法是采用两个放射源1及2，分别测定各源单独的净计数率（即已扣除本底）I_{01}及I_{02}；和测定两源在一起时的总净计数率$I_{0(1+2)}$，则

$$I_{01} + I_{02} = I_{0(1+2)}$$

或

$$\frac{I_1}{1 - I_1\tau} + \frac{I_2}{1 - I_2\tau} = \frac{I_{(1+2)}}{1 - I_{(1+2)}\tau}$$

由于τ值一般很小（通常约$<2\times10^{-4}$ s），上式可简化为：

$$\tau \simeq \frac{I_1 + I_2 - I_{(1+2)} - I_b}{2I_1 \cdot I_2} \qquad (2\text{-}13)$$

式中I_1，I_2及$I_{(1+2)}$分别为仅有源1、仅有源2及源1加源2时所测的计数率（均包括本底）；I_b为本底计数率。

三、主要材料及仪器

1. β放射源两个（强度最好接近，每个大约为 1×10^4 dpm 为宜）；

2. 自动定标器一台，前置放大器一个；圆柱型及钟罩型G-M计数管各一支；脉冲示波器一台。

四、实验步骤

1. 示波器测量法

将前置放大器输出信号接至示波器输入端，调节示波器有关旋钮，使能观察到类似图 2-1 的波形，找到第一个小脉冲出现的位置，根据已知的扫描时间，求出 τ_d，再根据与第一个原始脉冲有同等幅度的后来出现脉冲的位置，求出 τ_R。

2. 双源法

（1）先用半分钟时间测试一下源 1 及源 2 各放在什么样的几何位置，能使两者的计数率相接近（计数率最好能达到 $3-6\times10^3$cpm）；

（2）把源 1 置于步骤（1）所确定的位置，计数10分钟（目的是起码能累积 $3-6\times10^4$ 计数），得到 N_1；

（3）把源 2 置于步骤（1）所确定的位置（不要移动源 1 的位置！），计数10min，得到 N_{1+2}；

（4）把源 1 拿走（不要移动源 2 的位置！），计数10 min，得到 N_2；

（5）把源 2 也拿走，测 5 分钟，得本底计数 N_b；

（6）重复步骤（2）至步骤（5）三次，并将以上结果记入表 2-1 中。

表2-1

实验次序	放射源	测量时间(min)	累计数				计数率(cpm)	净计数率(cpm)	标准偏差σ
			N			$\overline{N}$			
1	(1)								
2	(1)+(2)								
3	(2)								
4	无								

五、结果及分析

1. 根据表2-1及有关公式，在不考虑漏计数与考虑漏计数两种情况下，分别求出源1，源2及源（1）+（2）的相对放射性（应标明误差范围）并作适当的解析；

2. 比较用示波器法及用双源法所得的τ值；

3. 为什么τ值的测定相当不精确？

六、主要参考资料

[1] 星火、向峰，生物物理学实验指导，31—40页，人民教育出版社，1961。

[2] FAO/IAEA，作物和土壤示踪教程，74—75页，原子能出版社，1980。

[3] Wang, C. H. et al., Radiotracer Methodology in the Biological Environmental, and Physical Sciences, 294—325, PRENTICE-HALL, INC. Englewood Cliffs, New Jersey, 1975.

实验三　固体闪烁计数技术

一、实验目的

1．了解固体闪烁计数器的基本结构；

2．掌握通用闪烁探头测α、β及γ射线的基本技术。

二、基本原理

根据核辐射照射到某些晶体（称为闪烁体）上能发出闪光的原理，进行探测射线的仪器，称为“闪烁计数器”。所用的闪烁体为固体时，称为固体闪烁计数器。它主要由探头（包括闪烁体、光电倍增管及前置放大器等）及定标器（包括高压电源、主放大器、脉冲幅度分析器或甄别器及计数系统等）组成，见图3-1。与G-M计数器相比，固体闪烁计数器有如下突出的优点：（1）测γ射线的效率比较高[用NaI(Tl)晶体时，可高达20至40倍]；（2）分辨时间极短约为

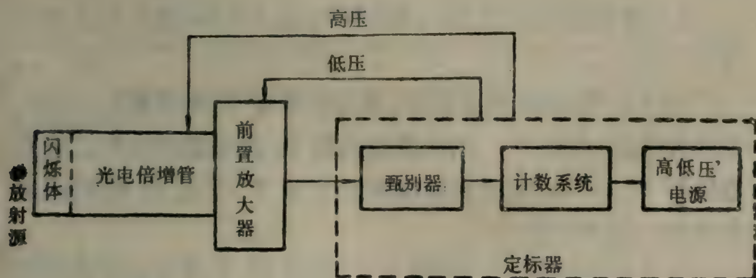


图3-1　固体闪烁计数器框图

10^{-6}s，就是计数率高至6×10^{4}cpm，也不存在显著的计数；（3）输出脉冲的幅度正比于γ光子在晶体中损失的能量，故有可能作γ能谱的测定。

为了提高探测效率，对不同的射线，往往采用不同类型的闪烁体。例如测α射线时，用ZnS（Ag）晶体；测β射射时，用塑料晶体；测γ射线时，用NaI(Tl)晶体等。

三、主要材料及仪器

1. ZnS(Ag)晶体、塑料晶体及NaI(Tl)晶体各一块；α、β及γ辐射源各一个；硅脂、镜头纸等。

2. 闪烁探头（FJ-336型或其他型号）一个；自动定标器（FH-408型或GP-1型等）一台。

四、实验步骤

1. 在老师指导下熟悉探头、定标器的基本结构及使用方法，记住注意事项，严禁光电倍增管加高压时曝光！否则昂贵的光电倍增管可能烧毁。当更换闪烁晶体时，应尽量减少光电倍增管曝光时间，换好后起码要暗适应几分钟才能使用。

2. 确定测量α射线（用^{239}Pu或^{241}Am源）的工作条件：

（1）用ZnS(Ag)晶体，源与闪烁体距离调至1—3mm，探头放大置“×1”，定标器输入极性开关置“－”，衰减选择置“1:1”，高压极性选择开关置“－”，把甄别阈固定在某一适当位置；

（2）改变高压，测量在不同高压下源及本底的计数率；

（3）改变甄别电压，重复步骤（2）三次，将结果记入表3-1中；

3. 确定测量β射线（$^{90}Sr-^{90}Y$源或^{32}P源）的工作条件：

用塑料晶体，源与闪烁晶体相距2—4mm，周围的γ源应拿至5m以外或放在铅室内（因本探头无铅屏蔽），探头放大倍数开关置“×10”，其余方法同上。注意，由于β能谱的连续性，在一般条件下，β源计数率与高压的关系没有明显的坪区，工作电压可选在计数率随高压变化比较缓慢之处。将结果记入表3-2中；

4. 确定测γ射线（^{137}Cs源）的工作条件：

用NaI(TI)晶体，当γ源能量较高时，探头放大倍数可置“×1”，否则置“×10”，测坪曲线的方法同上，坪曲线没有明显的坪区，工作电压可选在曲线拐点略偏低的地方。将结果记入表3-3中。

五、结果及分析

表3-1

高压（V）																		
甄别阈（V）																		
α源计数率																		
本底计数率																		

表3-2

<table>
<tr><td>高压（V）</td><td colspan="3"></td><td colspan="3"></td><td colspan="3"></td><td colspan="3"></td><td colspan="3"></td><td colspan="3"></td></tr>
<tr><td>甄别阈(V)</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>β源计数率</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>本底计数率</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
</table>

表3-3

<table>
<tr><td>高压（V）</td><td colspan="3"></td><td colspan="3"></td><td colspan="3"></td><td colspan="3"></td><td colspan="3"></td><td colspan="3"></td></tr>
<tr><td>甄别阈(V)</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>γ源计数率</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>本底计数率</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
</table>

根据表3-1，表3-2及表3-3画出在不同甄别阈情况下，高压与放射源计数率及本底计数率的关系曲线，确定测α、β及γ射线的工作条件，并确定在该工作条件下的探测效率。

六、主要参考资料

[1] Wang, C.H et al., Radiotracer Methodology in the Biological Environmental, and Physical Sciences, 122—141, PRENTICE-HALL, INC. Englewood Cliffs, New Jersey, 1975.

[2] FAO/IAEA, 作物和土壤示踪教程, 81—89, 原子能出版社, 1980年.

实验四　几何因子对放射性测量的影响

一、实验目的

1. 了解几何条件对放射性测量的影响；
2. 掌握合适几何条件的选择方法。

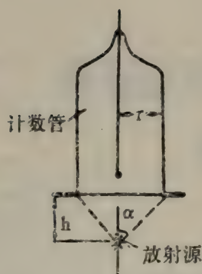
二、基本原理

放射性物质所发出的射线是向四面八方均匀地辐射的，除了4π计数管及液体闪烁计数器能测量放射源辐射出来的全部粒子外，一般的探测器仅能测量到其中的一部分。放射源对探测器所张的立体角越大，测到的部分就越多，即探测效率就越高。设所张的立体角Ω与4π之比称为相对立体角，用ω表示，ω也叫几何因子，则所测到的净计数率除以ω即为单位时间内放射源所发出的全部粒子数（吸收因子、分辨时间因子、反散射因子及探测效率等不考虑时），即

$$dpm \approx \frac{cpm}{\omega} \qquad (4-1)$$

对钟罩型计数管，几何因子决定于计数管窗的半径r及由源至计数管中央丝极端点的距离h，当放射源为点源，且位置又在管轴线上时，

$$\omega = \frac{2\pi}{4\pi}(1-\cos\alpha) = 0.5(1-\cos\alpha) \qquad (4-2)$$



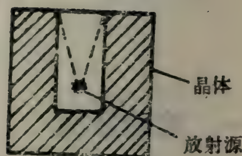


图4-1　G-M计数管几何条件　　图4-2　井型晶体几何条件

式中

$$\cos\alpha=\frac{h}{\sqrt{h^2+\gamma^2}}\text{（由图4-1可求出）}$$

如果放射源（样品）的大小与计数管窗相比不能忽略时，几何因子可用下式计算：

$$\omega=\frac{1}{2}\left[1-\frac{1}{(1+a^2)^{1/2}}-\frac{3ab}{8(1+a^2)^{5/2}}-b^2\left(-\frac{5}{16}\cdot\frac{a}{(1+a^2)^{7/2}}+\frac{35}{64}\cdot\frac{a^2}{(1+a^2)^{9/2}}\right)-b^3\left(\frac{35}{128}\cdot\frac{a}{(1+a^2)^{9/2}}-\frac{315}{256}\cdot\frac{a^2}{(1+a^2)^{11/2}}+\frac{1155}{1024}\cdot\frac{a^3}{(1+a^2)^{13/2}}\right)\right] \tag{4-3}$$

式中$a=\frac{r_1^2}{h^2}$；$b=\frac{r_2^2}{h^2}$；r_1——计数管的半径；r_2——样品的半径。

在测量γ辐射源时，为了改善几何因子，即为了提高探

测效率（当测量低能γ样品时，如^{125}I等尤其重要），常常采用井型晶体探头，将待测样品置于晶体井底部，如图4-2所示。

在放射性测量中，尤其是测α及β辐射体时，样品几何位置的选择很重要。多个样品要进行比较时，各个样品的几何位置应保持一致，且当样品愈靠近探测器，样品水平位置的改变对计数结果的影响就愈大。

三、主要材料及仪器

1. α、β及γ放射源各一个；

2. 自动定标器一台，钟罩型、圆柱型计数管探头、三用闪烁探头及井型闪烁探头各一个。

四、实验步骤

1. 用钟型（或圆柱型）计数管探头，将β放射源置于最靠近计数管窗的托盘中央，然后垂直往下逐层降低源与计数管的距离，分别测量各种距离时的计数率，将结果记入表4-1。

固定垂直距离，改变水平位置，测量各种位置时的计数率，将结果记入表4-2；

2. 用三用闪烁探头，改变α源与闪烁晶体（ZnS(Ag)）的垂直位置，测量计数率，将结果记入表4-3；

3. 用井型NaI(Tl)闪烁探头，将γ源置于井的不同位置，测量计数率，结果记入表4-4。

五、结果及分析

1. 将表4-1至表4-4画成计数率与几何位置的关系曲

线，并作分析；

2．在一般的相对放射性测量中，样品的几何位置应如何选择才比较合适？

表4-1

源与计数窗的垂直距离（mm）					
β源的计数率（cpm）					

表4-2

源与计数管的水平位置（mm）					
β源的计数率（cpm）					

表4-3

源与晶体垂直距离（mm）					
α源计数率（cpm）					

表4-4

源的位置	井底	井中1	井中2	井上部
γ源计数率（cpm）				

六、主要参考资料

[1] 星火、向峰，生物物理学实验指导，55—57页，人民教育出版社，1961.

[2] Wang, C. H et al., Radiotracer Methodology in the

Biological Environmental, and PhYsical Sciences, 310—314, PRENTICE-HALL, INC., Englewood Cliffs, New JerseY, 1975.

实验五　射线能谱分析

一、实验目的

1. 了解γ射线能量分布的特点；
2. 掌握单道能谱分析的基本方法；
3. 学习多道脉冲幅度分析的基本原理

二、基本原理

每一种放射性元素的辐射，都有着固定不变的能量成分，例如^{137}Cs的γ射线能量为0.662MeV。用能谱仪测量出每一种能量的辐射数目（单位时间内的计数N），以能量和相应的计数率作图，即为该元素的能谱，图5-3是^{137}Cs的γ

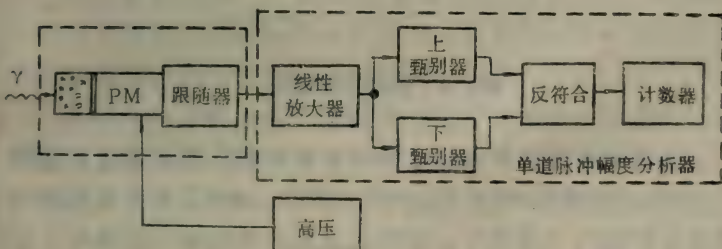


图5-1　NaI(Tl)单道γ能谱仪框图

射线能谱。谱能的测量不仅可以确定放射性元素的辐射强度，而且还可以区分元素的种类，某些探测器，如电离室、正比计数器和闪烁计数器所产生的脉冲幅度和射线的能量成正比，因此，测量这些探测器所产生的脉冲幅度，即进行脉冲幅度分析，就可以知道该辐射的能谱。

常用的能谱仪的基本结构如图5-1所示，它由闪烁探头、单道脉冲幅度分析器及高压电源等构成。单道脉冲分析器，有两个脉冲幅度甄别器，它们各有一个甄别阈（可调节）U_{S1}及U_{S2}，如图5-2，a）所示，它们允许幅度超过一定甄别阈的脉冲通过，而剔除幅度小于甄别阈的脉冲，阈电压（按绝对值）高的称为上甄别阈，为U_{S2}；阈电压低的称为下甄别阈，如U_{S1}。

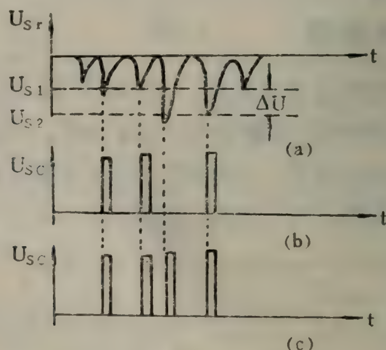


图5-2　能谱分析波形

能谱测量有两种方法，即微分法和积分法。前者是保持U_{S1}与U_{S2}的差值$\Delta U = U_{S2} - U_{S1}$不变，$\Delta U$又称为单道脉冲幅度分析器的“道宽”，从幅度大小不等的输入脉冲中，把落到道宽中的那些脉冲选出来输出，其他脉冲一律剔除，不

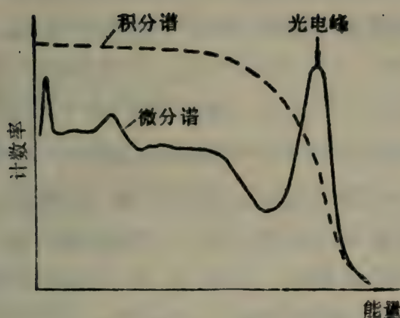


图5-3　^{137}Cs的能谱

予输出，如图5-2，b）所示。这样，当U_{s1}由小到大改变（U_{s2}也跟着改变，以保持ΔU不变），就可以把所有输入脉冲逐段地（每段为一个道宽）分选出来。达到脉冲幅度分析的目的，所测得的脉冲幅度谱（即计数率与脉冲幅度的关系曲线）称为微分谱，如图5-3中实线所示。由图可以看出，用NaI(Tl)晶体所得的γ射线能谱曲线比较复杂，这是由于γ射线与物质相互作用机制所决定。因光电峰直接反映γ射线的能量，形状也比较对称，所以光电峰可以作为γ能谱分析的依据。

积分法是只用一个下甄别阈，凡是幅度超过U_{s1}的脉冲一律给予输出，如图5-2，c）所示，改变U_{s1}所得出的能谱称为积分谱，如图5-3中的虚线所示。

多道脉冲分析器则无需逐道（逐段）测量，而是一次就能测出各道址中的脉冲计数。与单道脉冲幅度分析器相比，测量时间可大大缩短，仪器工作比较稳定（因各道的测量基本上在同一时间完成，测量条件基本上一致），故测量精确度比较高。

多道脉冲幅度分析器的基本结构如图 5-4 所示，模数变换器ADC系统把输入脉冲幅度Um作为模拟量，且转换成相应的脉冲数目n，作为数字输出，并将数码 n 直接用作被存贮事件的存贮单元的道址（地址）；由于 Um 正比于入射粒子的能量E，所以$n\propto E$。ADC的输出信号在道址定标器中进行计数，当变换结束时，ADC开启控制器，即把特定存贮位置中的存数读出到加“1”定标器中，加“1”后，再写回到同一存贮位置中，最后道址定标器复零，ADC线性门重新打开，以分析新的输入脉冲信号。

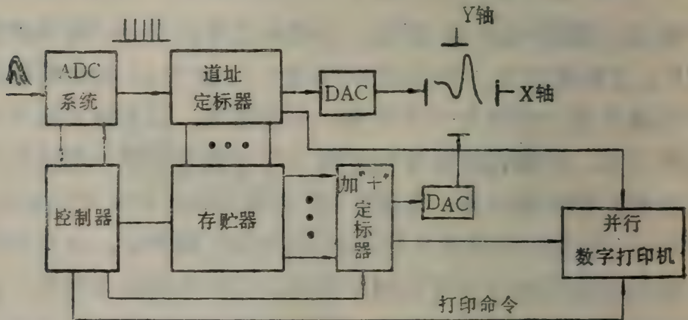


图5-4　多道分析器框图

γ能谱仪的主要指标是能量分辨率R、能量线性、分辨时间及稳定性等。R的大小表征把能量相近的谱线分开的能力，通常用NaI(Tl)晶体探测器所测得的^{137}Cs γ 光电峰的相对半宽度表示，即

$$R=\frac{W_{1/2}}{W}\qquad(5\text{-}1)$$

式中$W_{1/2}$——光电峰幅值半高处的宽度，用道数（或能量）表示；W——光电峰值所对应的道数（或能量）。

三、主要材料及仪器

1．γ辐射源：^{137}Cs，^{60}Co，^{125}I或γ系列源等；

2．单道γ能谱仪（GP-1型或其他型号）一台，多道脉冲幅度分析器（FH-419G1型或其他型号）一台。

四、实验步骤

1．在老师指导下了解单道及多道γ能谱仪的基本结构及操作方法；

2．用多道γ能谱仪观察、记录及分析^{137}Cs，^{60}Co，^{125}I或γ系列源的能谱（示范或在老师指导下进行）；

3．用单道γ能谱仪测^{137}Cs的微分谱；

（1）将道宽固定在某一值（一般为最大甄别阈值的20—30%）；

（2）先将甄别阈值调至某一值（相应于待测核素最大能量光电峰位置）；

（3）改变放大器的放大倍数，直至找到光电峰。此后保持此放大倍数不变；

（4）将甄别阈调至最小，再逐渐升高，进行微分测量，将结果记入表5-1中。

五、结果及分析

1．根据表5-1画出^{137}Cs的微分能谱，求出能量分辨率，并与用多道能谱仪所得的结果进行比较；

2．根据用多道能谱仪所测得的数据，试分析本谱仪的

表5-1

甄别阈（V）										
计数率（cpm）										

道宽＝V

线性，并用微电脑求出其拟合方程式（能量E 与道 数N的关系，一般可用如下的多项式表 示：$E=a_0+a_1N+a_2N^2$）。

六、主要参考资料

［1］ Wang, C.H et al., Radiotracer Methodology in the Biological Environmental, and Physical Sciences, 142—179, PRENTICE-HALL, INC. Englewood Cliffs, New Jersey, 1975.

［2］ 陈子元等，核技术及其在农业科学中的应用，243—270 页，科学出版社，1983.

实验六　液体闪烁计数器最佳工作条件的确定

一、实验目的

1．了解液体闪烁计数器的基本结构及工作原理；
2．掌握常用液体闪烁计数器的使用方法；

二、基本原理

液体闪烁计数法（简称液闪法）与固体闪烁计数法（简称固闪法）一样，是一种正比计数法，即输出脉冲的大小正

比于β粒子在闪烁体中所损耗的能量。所不同的是固闪法是把放射性样品置于闪烁体的外部；而液闪法是将放射性样品溶于有机闪烁液中，因此几乎不存在β粒子（或α粒子）的自吸收问题，这对^{3}H及^{14}C等低能核素的探测极为有利。此外，因有机闪烁体产生的荧光的衰减时间很短（约$10^{-9}s$），所以一般不需作分辨时间校正。

在液闪法中，影响测量精确度及测量效率等的因素比较多，就仪器而言，其中最主要的是光电倍增管的工作电压、放大器的放大倍数及脉冲幅度分析器的甄别电压等，且这些参数对不同能量的核素又常是各不相同的。在实际应用中，最好依不同测量对象作适当的调整，使仪器工作在最佳状态（注：随着现代液闪仪器性能的不断完善，较先进的仪器已可以始终自动保持在最佳工作状态，此时，操作者可免于调整上述参数）。

确定仪器最佳工作条件，常用如下两种方法：

1．平衡点测量

由于β谱是连续谱，在微分测量中（最常采用），它在道内有一定的分布，当β微分谱在通道内对称分布时，有最大微分测量效率，且可自动补偿小的增益波动，这种高计数效率又稳定的测量条件，称为“平衡点”，它包括道宽、道位置及增益（光电倍增管高压、放大器的放大倍数及衰减因子）等一组数据。一般道宽及其位置是确定的，此时，平衡点就是指确定道的增益，称为“平衡点增益”，计数效率η最大所对应的光电倍增管高压，称为“平衡点”。

2．使η^2/nb（称为测量装置的优值）达到最大值，其中η——计数效率，nb——本底计数率。优值愈大，达到期望的统计准确度所需的测量时间就可以愈少，所以优值是反映

测量仪器优劣的一个重要指标。

三、主要材料及仪器

1．^{3}H，^{14}C标准源各一瓶，本底瓶一个；

2．液体闪烁计数器（FJ-2100 型 或 其他型号）一台。

四、实验步骤

1．在教师指导下，了解所用液体闪烁计数器的基本结构、工作原理及操作方法；

2．确定测^{3}H的平衡工作点：

对FJ-2100型，将第一道的阈值调在0.5V，道宽调在1.4V；第二道阈值调在1.9V，道宽调在1.4V，改变光电倍增管高压，使第一、二道中的净计数率近似相等，则此时的高压就是测^{3}H的平衡工作点，将结果记入表6-1；

3．确定测^{14}C的平衡工作点：

对FJ-2100型，将第一道阈值调在0.8V，道宽调在3.3V；第二道阈值调在4.1V，道宽调在3.3V，改变高压，找到使第一、二道净计数率近似相等的高压，将结果记入表6-2；

4．根据优值来确定最佳工作点：

对FJ-2100型，测^{3}H时，阈值调在0.5V，道宽调在2.8V，在不同高压下，分别测^{3}H源及本底的计数率$I_{^{3}H}$及I_b，使$I_{^{3}H}/I_b$达最大值的高压即为测^{3}H的最佳工作点，将结果记入表6-3；测^{14}C时，阈值调在0.8V，道宽调在6.6V，其他步骤同^{3}H，将结果记入表6-4。

五、结果及分析

1．根据表6-1至表6-4作出各种情况的高压-计数率或高

表6-1

高压（V）										
^{3}H计数率	第一道									
	第二道									

表6-2

高压（V）										
^{14}C计数率	第一道									
	第二道									

表6-3

高压（V）								
^{3}H计数率（cpm）								
本底计数率（cpm）								

表6-4

高压（V）								
^{14}C计数率（cpm）								
本底计数率（cpm）								

压-优值关系曲线，求出相应的最佳工作点，并加以比较；

2. 计算在最佳工作条件下，测^{3}H及^{14}C的计数效率及优值。

六、主要参考资料

[1] 中国科学院生物物理研究所，液体闪烁计数及其在生物学中的应用，18—19页，科学出版社，1979。

[2] 陈子元等，核技术及其在农业科学中的应用，89—91页，科学出版社，1983。

[3] Wang, C.H et al., Radiotracer Methodology in the Biological Environmental, and Physical Sciences, 181—225, PRENTICE-HALL, INC. Englewood Cliffs, New Jersey, 1975.

实验七　用内标准源法测定计数效率

一、实验目的

1. 了解液体闪烁计数中淬灭现象对测量工作的影响；
2. 掌握用内标准源法确定计数效率的方法。

二、基本原理

在液体闪烁计数中，由于样品和探测介质混合在一起，样品对探测就有影响，闪烁液-样品系统中的杂质、水分、氧及颜色等的存在，使样品β射线所产生的、能达到光电倍增管的光子数减少了，这种现象称为“淬灭”。不同的样品，淬灭程度不同，因而探测效率也就各不相同，显然测量

所得的相对数是无法进行比较的。为了比较，就要对各个样品的计数效率加以测定，然后由各样品的计数率换算为样品的衰变率，这一过程称之为“淬灭校正”。

淬灭校正的方法有多种，常用的有内标准源法、内道比法及外标准道比法等。

内标准源法是准确度最高的校正方法，也是校正严重淬灭的最好方法，其基本原理是先对样品计数，得I_1，再加入一定量的已知放射性活度为A的同类放射性核素（即内标准源），再计数一次，得I_2，并且假定：

1．加入的内标准源属非淬灭源；

2．加入的内标准源与样品受到同样的淬灭；

3．内标准源的量很小，一般只占样品体积的百分之一或更少，所以由于体积的改变而带来的误差，可以忽略不计；

4．内标准源和样品的放射性核素相同，或至少其β谱极相似。

则样品的计数效率η_s等于内标准源的计数效率，且可用下式表示：

$$\eta_s = \frac{I_2 - I_1}{A} \times 100\% \qquad (7-1)$$

于是样品的衰变率为

$$A_s = \frac{I_1 - I_b}{\eta_s} \qquad (7-2)$$

式中I_b为本底计数率。

三、主要材料及仪器

1．^3H-正十六烷标准液；^{14}C-正十六烷标准液；^3H及

^{14}C标记样品；

2．闪烁液，配方：PPO2g，POPOP0.025g，甲苯0.5l；

3．移液管、专用移液装置及8个计数瓶；

4．液体闪烁计数器1台。

四、实验步骤

1．在8个计数瓶中皆装入等体积（例如10ml）的闪烁液；

2．用移液管分别取100μl的^{3}H标记物溶液至第1，2及3号瓶中，测量1至4号瓶的计数率，结果记入表7-1；

3．用专用移液装置准确地各取10μl（或100μl）的^{3}H标准液至第1，2及3号瓶中，再测各瓶的计数率，将结果记入表7-1；

4．第5，6及7号瓶用于^{14}C标记物溶液及^{14}C标准液，方法与步骤2，3相同，将结果记入表7-1中；

5．在本底瓶4号及8号中分别加入与步骤3、步骤4相同的标准液，测出^{3}H及^{14}C的计数率。

五、结果及分析

1．由所测得的数据，按公式（7-1）、（7-2）算出测^{3}H及^{14}C的计数效率及^{3}H，^{14}C标记样品的衰变率。

2．假定在所用的闪烁液中，^{3}H及^{14}C标准液不产生淬灭作用，再由步骤5的结果，估计本实验所用^{3}H及^{14}C标记样品的淬灭程度。

表7-1

样品编号	I_1 (cpm)	$\overline{I_1}$ (cpm)	I_2 (cpm)	$\overline{I_2}$ (cpm)	I_b (cpm)	η_s (%)	A_s (dpm)
1						(^3H)	(^3H)
2							
3							
4							
5						(^{14}C)	(^{14}C)
6							
7							
8							

六、主要参考资料

[1] 陈子元等，核技术及其在农业科学中的应用，95—96 页，科学出版社，1983。

[2] 中国医学科学院第七研究室，同位素技术及其在生物医学中的应用，39—46 页，科学出版社，1977。

实验八　用道比法测定计数效率

一、实验目的

1．掌握液体闪烁β能谱的测定方法；

2．了解β能谱受淬灭的影响情况；

3．掌握用内道比法及外标准道比法测定计数效率的方法。

二、基本原理

在液体闪烁测量中，任何实际样品都存在一定的颜色及化学杂质等，因此都会产生程度不同的淬灭现象，以致即使含有放射性量相同的各个样品，也得不到相同的计数，因此，必须对实际样品的计数进行适当的校正，才能得到有用的数据。因淬灭的影响，使β谱向低能方向漂移，因此，我们可以设置合适的A，B两道，见图8-1。通过测量β谱形的变化或两道计数比（称为“道比”）$R=N_A/N_B$的变化，来

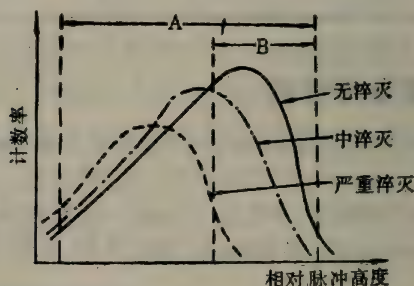


图8-1　淬灭对β能谱的影响

了解淬灭影响的程度。基本方法是在一系列（一般为七、八个）放射性活度已知的无淬灭样品中，加入不同量的淬灭剂，作为标准淬灭源，测出各个计数效率η及相应的道比值R，作出η-R曲线，称为淬灭校正曲线，以后测量同类样品时，只要测出道比值，由已知曲线就可查出对该样品的计数效率，这就是“内道比”法。

内道比法的主要缺点是当分析那些放射性活度比较低的样品时，为积累起统计学上需要的计数，所花的测量时间太长。为此更常采用“外标准道比法”，它是在样品瓶的外部，设置一个^{137}Cs或^{226}Ra等γ源，此γ源与闪烁液、样品瓶等作用产生的康普顿电子谱，也和样品的β谱一样，随淬灭程度不同而发生不同程度的漂移，见图8-2。因此，可另设置两个合适的道（外道），两外道计数率比（称为“外道比”）也和样品β谱一样，随淬灭程度不同而改变。同理，可预先绘制出效率-外道比曲线，以后在测同类样品时，只要测出外道比，就可查出对应的该样品的计数效率（在较先进的液闪仪中，内设的微处理机可自动完成淬灭校正，直接给出每一样品的计数效率及衰变率等）。

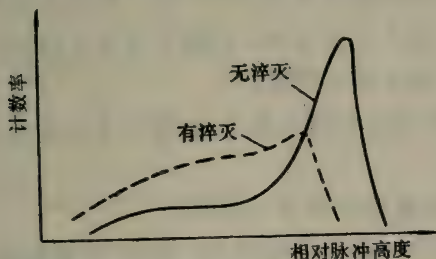


图8-2　淬灭对康普顿电子谱的影响

三、主要材料及仪器

1. ^{3}H-正十六烷及^{14}C-正十六烷标准液，^{3}H及^{14}C标记样品；

2. 闪烁液配方：PBD　5.5g，POPOP　0.3g，奈57.5g；二氧六环　0.5l；

3. 淬灭剂：CCl_4，甲基橙溶液；

4．液体闪烁计数器一台，多道脉冲幅度分析器一台，移液管。

四、实验步骤

1．制备标准淬灭源：

取32个规格相同的计数瓶，每只均加进10μl闪烁液，在1至16号瓶中再准确地加入活度相同且已知的^{3}H标准液（用专用移液管或微量注射器），一般用1×10^{5}dpm。在17至32瓶中准确地加入1×10^{5}dpm的^{14}C标准液，1至8号瓶及17至24号瓶用CCl_4作为化学淬灭剂，淬灭剂用量的递增可参考表8-1，或由实验决定，要求各瓶的相对计数效率变化对^{3}H由100%减少至20%左右；对^{14}C，由100%减少至30%左右。

第9至16号瓶及第25至32号瓶，用甲基橙溶液作为颜色淬灭剂。根据上面所述相对计数效率变化的原则，由实验确定各瓶甲基橙溶液的用量。

2．用多道分析器观察及分析淬灭与非淬灭的各种β能谱；

3．用内道比法作淬灭校正：

根据所测β能谱分布特点，选择合适的A、B两道，测量各个淬灭源在两道中的计数率，将结果记入表8-1；

4．用外标准道比法作淬灭校正：

根据样品β能谱及所用外γ源的康普顿电子谱的分布，选择合适的两外道，对FJ-2100型液闪仪，测^{3}H时，用II测量方式；测^{14}C时，用III测量方式，将结果分别记入表8-2至表8-5中。

五、结果及分析

表8-1

CCl_4用量（滴）	0								
N_A (cpm)									
N_B (cpm)									
$R=N_A/N_B$									
$\eta=N_A/dpm(\%)$									

表8-2

CCl_4用量（滴）	0							
^3H道计数率(cpm)								
^3H计数效率（%）								
外标准道 1 计数								
外标准道 2 计数								
外道比 R								

1. 根据表8-1至表8-5的结果画出各种情况下的计数效率-道比校正曲线；

2. 用微电脑对各种校正曲线进行拟合，求出相应的数

表8-3

甲基橙用量（滴）	0							
^{3}H道计数率(cpm)								
^{3}H计数效率（%）								
外标准道 1 计数								
外标准道 2 计数								
外道比 R								

表8-4

CCl_4用量（滴）								
^{14}C道计数率(cpm)								
^{14}C计数效率（%）								
外标准道 1 计数								
外标准道 2 计数								
外标准道1′计数								
外标准道2′计数								
外道比 R								

表8-5

甲基橙液用量（滴）	0							
^{14}C道计数率(cpm)								
^{14}C计数效率（%）								
外标准道 1 计数								
外标准道 2 计数								
外标准道1′计数								
外标准道2′计数								
外道比 R								

学方程式（要求相关系数≥90%），并加以比较；

3．总结怎样才能得到比较准确的淬灭校正曲线。

六、主要参考资料

[1] 中国医学科学院第七研究室，同位素技术及其在生物医学中的应用，46—68 页，科学出版社，1977。

[2] 中国科学院生物物理研究所"液闪"编译组，液体闪烁计数及其在生物学中的应用，151—163 页，科学出版社，1979。

[3] Wang, C. H. et al., Radiotracer Methodology in the Biological Envionmental, and Physical Sciences, 219—225, PRENTICE-HALL, INC. Englewood Cliffs, New Jevsey, 1975.

实验九　切伦科夫计数技术

一、实验目的

1. 了解切伦科夫辐射能谱的特点；
2. 掌握切伦科夫计数法的基本技术。

二、基本原理

当带电粒子通过介电物质时，只要它的速度大于光在该介质中的速度，就会发出一种方向性极强的光，称为"切伦科夫辐射"。利用探测切伦科夫辐射来探测核辐射的方法，称为"切伦科夫计数法"。与液体闪烁计数法相比，其主要优点是不必用昂贵且有毒的闪烁液，只要有对切伦科夫辐射透明的介质（如水）就行了，因此，制样简便、经济、没有化学淬灭、样品容量可以很大以及本底比较低等。

可以证明，产生切伦科夫辐射的必要条件是β粒子的能量不小于该介质的切伦科夫辐射阈能E_{th}，且有

$$E_{th}=0.511\left(\sqrt{\frac{1}{n^2-1}+1}-1\right)\text{MeV} \tag{9-1}$$

式中，n为介质的折射率。对于水，$E_{th}=0.265\text{MeV}$。

切伦科夫计数效率η不仅与n有关，且与β粒子的能量关系极大，当β粒子的最大能量E_{max}小于1MeV时，计数效率很低；当E_{max}大于1MeV后，η迅速增加。因此，切伦科夫计数技术主要用于测量^{32}P，^{86}Rb及^{42}K等高能β辐射体。若

和液体闪烁计数法相结合，还可使某些双标记或多标记样品的测量简化。

与玻璃样品瓶相比，采用聚乙烯瓶可得到较高的计数效率，但在水介质中加入适当的化合物（称为波长转换剂）乃是显著提高切伦科夫计数效率的最重要的方法。实用的波长转换剂有4-甲基伞形酮、萘磺酸、Triton X-100、水杨酸钠及水杨酸甲脂等。

以水为介质时，切伦科夫计数法没有化学淬灭现象，但仍存在颜色淬灭，所以当样品存在颜色时，应加以脱色或进行颜色淬灭校正。

当加入波长转换剂时，一般还应作化学淬灭校正。

三、主要材料及仪器

1. 放射源：$Na_2H^{32}PO_4$、^3H-正十六烷、^{14}C-正十六烷；

2. 闪烁液，配方为：PBD 5.5g，POPOP 0.3g，萘57.5g，二氧六环 500ml；

3. 波长转换剂：水杨酸钠，Triton X-100，水杨酸甲脂等；

4. 微量注射器、移液管、橙色及蓝色染料，乙醇及硝基甲烷淬灭剂。

5. 仪器：液体闪烁计数器（FJ-2100型或其他型号）一台，多道脉冲幅度分析器一台。

四、实验步骤

1. 取26个玻璃计数瓶，编号为1，2，3…26，其中第1至第4号瓶各加10ml闪烁液。第5至第22号瓶各加10ml蒸

馏水。第2至第4号瓶及第6至第26号瓶皆各加入准确相等的^{32}P（衰变数为1×10^{5}dpm左右为合适）；

2. 测定^{32}P的dpm数：

第1至第4号瓶作全窗液闪计数，1号瓶作为本底计数，另外三瓶所得计数取平均值，所求得的净cpm数（即不含本底）N_0，一般可近似当成为该样品的^{32}P的dpm数。

3. 确定切伦科夫计数的工作条件：

第5号瓶（作本底计数）及第6号瓶分别置入计数室，调节闪烁计数器的有关旋钮（例如甄别阈、道宽，有时还要调节高压或放大倍数等），找到计数效率比较高、本底比较低及工作比较稳定的工作条件（最好作出^{32}P切伦科夫计数微分谱），即求出甄别阈＝？，道宽＝？，高压＝？及放大衰减＝？。将结果记入表9-1。

用多道脉冲幅度分析器分析^{32}P切伦科夫辐射脉冲谱并与^{3}H液体闪烁脉冲谱相比较。

4. 确定^{32}P切伦科夫计数效率：

以步骤3所确定的工作条件，测量第6至第8号样品，所得的净cpm数为N_c，则^{32}P的切伦科夫计数效率η由下式求出：

$$\eta=N_c/N_0 \qquad (9-2)$$

5. 观察低能β射线对切伦科夫计数是否有影响：

在第6至第7号样品中再分别加^{3}H或^{14}C等，观察计数率是否会增加。

6. 颜色淬灭校正，分析切伦科夫颜色淬灭脉冲谱：

利用内道比淬灭校正法，测定颜色深度不同的样品，研究其计数效率η与内道比R的关系。第9至第15及第16号至第22号样品分别作橙色及蓝色淬灭校正，将结果填入表9-2

中。

用多道脉冲幅度分析器分析各种颜色淬灭谱。

7. 研究波长转换剂的作用

在第23号瓶中加入1%的水杨酸钠水溶液；在第24号瓶中加入30%的Triton X-100水溶液；在第25号瓶中加入30% Triton X-100+1%水杨酸钠水溶液；在第26号瓶中加入90%水杨酸甲脂+10%乙醇的溶液，分别测量各瓶的计数，并用多道分析器分析各瓶的β能谱，各瓶再加入不同量的硝基甲烷淬灭剂，研究受化学淬灭剂影响的情况。

五、结果及分析

表9-1 切伦科夫计数最佳工作条件

甄别阈（V）	道宽（V）	高压（V）	放大衰减

表9-2 切伦科夫计数颜色淬灭校正

内道比R										
计数效率η(%)	橙色									
	蓝色									

1. 根据步骤3测量情况，确定本仪器切伦科夫计数的最佳工作条件，填入表9-1。

2. 根据表9-2，制作^{32}P切伦科夫计数颜色淬灭校正曲线，并利用微电脑求出相应的拟合方程式（可用多项式拟

合，要求相关系数大于90%）。

3． 根据表9-3，及微分谱的分析，总结波长转换剂对切伦科夫计数的作用。

4． 总结有波长转换剂的混合介质中，切伦科夫计数受化学淬灭剂影响的情况。

表9-3

硝基甲烷量（滴）		0							
在各介质中的计数效率（%）	水								
	1％S. A. Na								
	30％T. X								
	30％T. X+1％S. A. Na								
	90％M. S+10％乙醇								

六、主要参考资料

［1］ Charles R. Gruhn., L. S. C. Recent Applications and Development, 357—374, Academic Press, New York, I, 1980.

［2］ Ross H. H., L. S. C. Recent Applications and Development, 375—385, Academic Press, New York, I, 1980.

［3］ CARMON, B., Int. J. Appl. Radiat. Isotopes 30, 97—99, 1979.

［4］ 李藻发，中山大学学报（自然科学版），3，128，1984。

［5］ 中国科学院生物物理研究所“液闪”编译组，液体闪烁计数及其在生物学中的应用，358—379，科学出版社，1979。

实验十　双标记示踪样品的测量

一、实验目的

1. 学习复杂β能谱的分析方法；
2. 掌握双标记生物样品的测量技术。

二、基本原理

在通常的生物学示踪实验中，仅使用一种核素进行示踪，即“单标记法”。有时希望在一个实验中，就同时了解两种或多种核素在同一体系中的不同功能，即“双标记法”或“多标记法”。例如，把^{32}P与^{45}Ca两种核素标记的化合物用于活体研究，可在一个实验中同时监测磷和钙的代谢情况；用^{3}H和^{32}P双标记法研究植物细胞DNA的合成率等等。多标记法的优点是显而易见的，它常可解决用其他方法难以解决的问题。然而，该法对测量分析技术要求比较高，主要是对混在一起的两种或多种β放射性如何进行计数，或如何把它们分离开，分别对每一种β粒子进行计数。

在液体闪烁计数中，对双标记样品，可以采用“同时测定法”，也可采用“不同的计数法”等。

同时测定法是设置合适的两个道，如图10-1，则高、低能核素的活度A_H，A_L可用下面各式算出。

由图10-1可得：

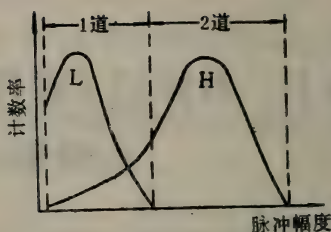


图10-1

$$\begin{cases} C_1 = A_L \cdot \eta_{L1} + A_H \cdot \eta_{H1} \\ C_2 = A_L \cdot \eta_{L2} + A_H \cdot \eta_{H2} \end{cases} \tag{10-1}$$

由此可解得：

$$A_H = \frac{C_1 - C_2(\eta_{L1}/\eta_{L2})}{\eta_{H1} - \eta_{H2}(\eta_{L1}/\eta_{L2})} \tag{10-2}$$

$$A_L = \frac{C_2 - C_1(\eta_{H2}/\eta_{H1})}{\eta_{L2} - \eta_{L1}(\eta_{H2}/\eta_{H1})} \tag{10-3}$$

式中 C_1 ——在 1 道中测到的总净计数率；

C_2 ——在 2 道中测到的总净计数率；

η_{L1} —— 1 道对低能核素的测量效率；

η_{L2} —— 2 道对低能核素的测量效率；

η_{H1} —— 1 道对高能核素的测量效率；

η_{H2} —— 2 道对高能核素的测量效率。

如果分析道设置得如图10-2所示，则上两式可简化为：

$$A_H = \frac{C_2}{\eta_{H2}} \tag{10-4}$$

$$A_L = \frac{C_1 - \eta_{H1}(C_2/\eta_{H2})}{\eta_{L1}} \tag{10-5}$$

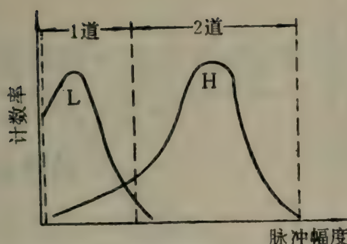


图10-2

此法适用于^{3}H-^{14}C、^{32}P-^{33}P、^{32}P-^{45}Ca、^{32}P-^{3}H及^{125}I-^{131}I等双标记样品。

当双标记样品的高能核素的β粒子$E_{max} \geq E_{th}$，而其低能核素的β粒子$E_{max} < E_{th}$时，可采用"不同的计数法"。此法是先测定双标记样品中高能核素的活度A_H（用切伦柯夫计数法），然后用液体闪烁计数法测定此双标记样品，此时两道的设置如图10-2所示，只要预先刻度好两种核素在1道中的测量效率，再由A_H可算出高能核素对1道的贡献，双标记样品在1道中的总计数减去高能核素对1道的贡献，就是低能核素对1道的贡献，由此可用下式算出低能核素的活度

$$A_L = \frac{C_1 - A_H \cdot \eta_{H1}}{\eta_{L1}} \tag{10-6}$$

双标记样品的淬灭校正比较复杂，要先制备高、低能核素各一组淬灭标准源，然后制作η_{H1}-R，η_{H2}-R及η_{L1}-R三条外标准道比曲线，如图10-3所示。

对任一与淬灭标准源核素相同或相似的双标记样品，只要测得C_1、C_2及R，就可由道比曲线求得相应的计数效率η_{L1}，η_{H1}及η_{H2}，再利用公式（10-4）及（10-5）求出A_H及

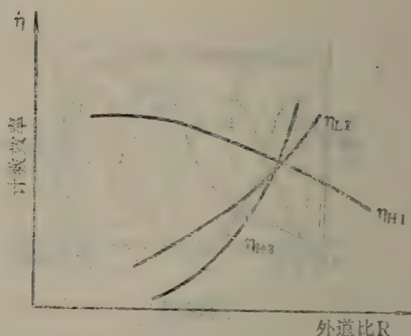


图10-3　双标记外标准道比曲线

A_L。

三、主要材料及仪器

1. 放射源：^3H-正十六烷标准液、^{14}C-正十六烷标准液及$^3H+^{14}C$双标记生物样品；

2. 闪烁液，配方为：PBD5.5g，POPOP0.3g，萘57.5g，二氧六环500ml；

3. CCl_4淬灭剂、移液管、微量注射器及计数瓶等；

4. 仪器：液体闪烁计数器一台。

四、实验步骤

1. 制备^3H及^{14}C标准淬灭源各八瓶；

2. 测出非淬灭^3H及^{14}C的微分谱，参照图10-2选择合适的1道及2道（即是使1道包括^3H的全谱；使^3H溢进2道的计数效率在0.1%以下，以致^3H在2道的贡献可以忽略不计）；

3. 利用标准淬灭源，测出η_{3H1}-R，η_{14C1}-R及η_{14C2}-

R的关系曲线；

4. 测量未知（$^{3}H+^{14}C$）双标记生物样品的外标准道比。

五、结果及分析

表10-1

甄别阈（V）									
^{3}H计数率(cpm)									
^{14}C计数率(cpm)									

道宽＝　V

表10-2

CCl_4用量（滴）		0								
外道比										
^{3}H在1道	计数率（cpm）									
	计数效率（%）									
^{3}H在2道	计数率（cpm）									
	计数效率（%）									

1. 根据表10-1画出非淬灭的^{3}H及^{14}C的微分谱。

2. 根据表10-2及表10-3制作$\eta_{3H1}-R$、$\eta_{14C1}-R$及$\eta_{14C2}-R$淬灭校正曲线，并用微电脑求出对应的拟合方程式（可用

表10-3

CCl$_4$用量（滴）		0								
外道比										
^{14}C在1道	计数率（cpm）									
	计数效率（%）									
^{14}C在2道	计数率（cpm）									
	计数效率（%）									

多项式拟合，要求相关系数大于90%）。

3．由测出未知样品的外道比值，在校正曲线上或由拟合方程式求出未知样品的计数效率：η'_{3H1}、η_{14C1}及η'_{14C2}，再由公式（10-4），（10-5）计算出未知双标记样品中^{3}H及^{14}C的放射性活度。

4．试总结如何提高双标记样品的测量准确度。

六、主要参考资料

[1] 中国医学科学院第七研究室，同位素技术及其在生物医学中的应用，68—81页，科学出版社，1977。

[2] 陈子元等，核技术及其在农业科学中的应用，91—101页，科学出版社，1983。

[3] 李藻发等，中山大学学报（自然科学版），3，118，1983。

[4] Bem，H et al.，Journal of RadioanalYtical ChemistrY，52（2），361—367，1979.

[5] Gringorten，J. L.，Int. J. Appl. Isot.，Vol.34，No.9，1367—1376，1983.

实验十一　放射性同位素实验室规则及安全操作

一、实验目的

了解安全使用放射性同位素，熟悉放射性同位素实验室的规则，掌握放射性同位素制剂的开瓶、取液方法。

二、基本原理

放射性元素的原子核会自发地放出射线，因此若不遵守实验室规则，不严格按照操作规程进行实验，小则污染实验的器皿，造成实验结果不准确，大则有可能因放射源打翻而污染桌面地板，造成严重的事故，为保证实验能顺利进行，一定要牢牢掌握放射性同位素实验室操作规程，严格遵守实验室规则。

生产的放射性同位素制剂，由于其比强度较大，因此使用时，必须进行开瓶、稀释才能使用。

三、材料与仪器

$Na_2H^{32}PO_4$溶液，小烧杯、瓷盘、吸水纸、防护屏、剪刀、镊子、微量注射器、微量进样品、定标器、沾污仪。

四、实验步骤

1．了解放射性同位素实验室的操作规程。

（1）进入实验室前必须穿戴个人防护用品（工作服、工作鞋、手套、必要时要戴口罩、帽子等）；

（2）实验室内严禁存放食物及与工作无关的物品，严禁在实验室内吸烟、饮水和进食；

（3）实验室应保持清洁卫生，经常用沾污探测仪检查室内本底；

（4）放射性用量计算，以及使用移液管或微量注射器的种类必须经第二者核对；

（5）一切操作应在铺有吸水纸的瓷盘内进行；

（6）实验之后，要将非放射性及放射性物品器皿分别进行清洗处理。

2. 放射性同位素的衰变修正计算。根据出厂说明书，和公式$A_t = A_0 \cdot e^{-\lambda t}$，计算放射性同位素经过时间t以后的现有量。例如$^{32}P$的说明书如下：

表11-1 ^{32}P说明书

核素	状态	测量日期	比活度 Bq/ml	体积 ml	总活度 Bq	pH6.5载
^{32}P	无色透明磷酸二氢钠溶液	1984.8.10.	4.44×10^8	0.5	2.22×10^8	体口服剂

从实验当天的日期推算到说明书中的测量日期，这段时间的总天数为t，求出^{32}P的A_t值。

3. 根据实验设计所需的核素使用量，计算从原液取出的体积：根据实验设计所需的核素使用量与说明书中给出的体积以及经衰变计算后^{32}P的现有总活度（或比活度）之间的比例关系，便可求出在原液中应取的体积。

4. 放射性同位素开瓶取液的安全操作。开瓶时必须针对放射性同位素所放出的射线种类、能量大小、放射源的强弱而采取不同的防护措施。对γ射线的放射源，能量又比较

大的（如^{65}Zn，^{60}Co）必须采用铅砖，铅玻璃等作为防护屏，并计算安全的工作时间，对^{125}I用铅玻璃作防护屏。而对^{32}P用有机玻璃作防护屏，对^{3}H一般可不用防护屏。开瓶必须在通风橱进行，操作的每一步骤都必须熟练、快速、不失误，避免发生事故。溶液转移于其他容器时，要用标签标明放射性同位素的名称、强度、体积、年月日。准备好合适的吸液器、垫有吸水纸或棉花的小烧杯，上述物品均放在垫有吸水纸的瓷盘上。首先打开罐子，用中号镊子小心取出^{32}P源瓶子，放入一个垫有吸水纸的小烧杯中，去金属封口，揭开胶塞，注意胶塞一定要反方向放在吸水纸上，然后迅速又准确的吸取所需体积于预先准备好的容器中。这时把源的瓶塞盖好，放回容器罐中。若遇到安瓿瓶时可用开瓶器的电热丝通电而使瓶颈断开或用砂轮锯开。

按步骤2，3，若需要3.7×10^{4}Bq的^{32}P计算应取原液多少体积？取出之原液稀释100倍，然后从此稀释液中取两个各为10μl的平行样品于测量碟上烘干，测量其放射性强度。

五、结果与分析

记录取样测定结果，若样品有误差分析其原因，总结放射性操作过程应注意的问题。

六、主要参考资料

[1] A.M.库津等著，吴伯泽译.生物学中的示踪原子法，311—373，科学出版社，1958。

[2] 中国科学院原子能研究所编，放射性同位素应用知识，科学出版社，328—338，1959。

[3] 陈子元、温贤芳、胡国辉主编，核技术及其在农业科学中的应用，324—339，科学出版社，1983。

实验十二 放射性污染的检测及去除污染的方法

一、实验目的

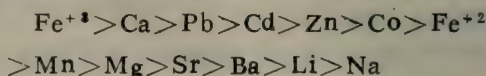
1. 通过实验掌握各种放射性监测仪的使用方法。
2. 了解清除污染的意义和原理。
3. 掌握对实验物品去污的方法和对去污剂的选择。

二、基本原理

在放射性示踪工作中，经常需要知道工作人员本身，或者实验室的仪器和设备。实验过程中是否被放射性物质所污染。通过监测仪的检查，可以达到上述目的。对污染的物品、必须进行清除，否则影响工作人员的健康。另外，本底增大会影响测量结果的准确性。

去污方法分化学和物理方法两种，本实验主要介绍化学方法。此方法包括使用各种酸或碱、洗涤剂和络合剂。

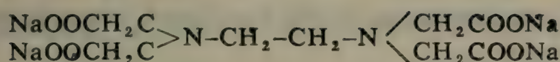
现以乙二胺四乙酸钠为例介绍其去污原理：EDTA-Na为无色无味之结晶固体，是一种氨羧络合物，它具有较强的络合能力，除碱金属外，绝大多数的金属离子都能与EDTA-Na生成稳定的络合物，它与金属元素的络合力受溶液pH的影响。在0.1M盐酸中与金属的结合力，可排成下列顺序：



$$Fe^{+3}>Ca>Pb>Cd>Zn>Co>Fe^{+2}$$
$$>Mn>Mg>Sr>Ba>Li>Na$$

从这个排列中可以看到EDTA-Na与Fe^{+3}络合能力最强，而Na就最弱了。

EDTA-Na结构式如下：



$$\begin{matrix} NaOOCH_2C \\ NaOOCH_2C \end{matrix} > N-CH_2-CH_2-N < \begin{matrix} CH_2COONa \\ CH_2COONa \end{matrix}$$

除碱金属外，当其它任一种金属元素存在时，钠极易被他种金属所取代而使他种金属与EDTA-Na络合，与EDTA-Na络合后的金属元素有离子化性质，正是利用它的这种性质，来去除放射性金属核素的污染，较之其它洗液效果良好。

三、材料、仪器

1. 布，塑料片，玻璃。
2. 0.5%EDTA-Na。
3. 1N HCl。
4. 5% NaOH。
5. 10%柠檬酸钠。
6. 1%洗洁精。
7. 0.1N HCl中加入0.5%EDTA-Na。
8. 各种型号的监测仪。
9. G-M计数器。

四、实验步骤

1. 用G-M计数器测量各种实验材料的本底（二个平行样品）。

2. 三种试验材料（布、塑料片，玻璃）放入同一种核素溶液中，片刻取出，用吸水纸吸干、红外线灯烘干。测量每块材料的放射性活度。

3. 上述三种材料用同一种去污剂冲洗，每块材料每次

约用10ml去污剂冲洗。重复洗涤三次，最后用自来水冲洗一min，后用吸水纸吸干，红外线灯烘干，再测其放射性活度。计算其去污率。

4. 取2—3种核素，用同一种试验材料(例如布或玻璃)和同一种去污剂（例如1N盐酸或其它）冲洗后，用吸水纸吸干，红外线灯烘干，测其放射性活度，计算其去污率。

五、结果与分析

表12-1 相同的核素和去污剂，不同的试验材料去污率比较

核素（^{32}P，^{86}Rb，^{51}Cr，^{45}Ca其中一种）

试验材料	去污剂	去污前脉冲 I_0	去污后脉冲 I	去污率$=\frac{I_0-I}{I_0}\times 100\%$
布	5%NaOH（或其它）			
塑料片				
玻　璃				

表12-2 相同试验材料和去污剂，不同的核素去污率比较

核素	试验材料	去污剂	去污前脉冲 I_0	去污后脉冲 I	去污率$=\frac{I_0-I}{I_0}\times 100\%$
^{32}P	玻璃	5%NaOH			
^{86}Rb	玻璃	5%NaOH			
^{45}Ca	玻璃	5%NaOH			
^{51}Cr	玻璃	5%NaOH			

1. 填写下列表格各原始数据；

2. 计算被污染的每块材料经去污处理后残留的放射性强度。

六、主要参考资料

[1] 中国科学院原子能所，放射性同位素应用知识，1959 年。

[2] 中国农科院原子能研究所译，作物和土壤示踪教程，国际原子能机构技术报告丛书，1980。

[3] 范深根编，放射性物质的安全使用，164—170 页，原子能出版社，1983。

实验十三　^{32}P在鱼体的吸收与分布

一、实验目的

1. 了解^{32}P在鱼体各器官组织的分布；

2. 比较不同的引入途径（腹腔注射、食道灌入、水中自由吸入）测定^{32}P在鱼体分布的差别。

二、基本原理

组成动物体的原子和分子是由一些元素或化合物的原子和分子不断地通过正常的新陈代谢过程来置换更新的，这种更新叫做生物学的转换，即体内的元素通过尿、粪便和呼气排出体外，新的原子和分子通过生物的呼吸、消化食物、水分等而进入体内。由于外界环境因素的不同，其转换率的变化差别很大，但转换率并不因为元素的同位素不同而不同，也就是同一种元素的同位素应有相同的转换率。

有些元素比较均匀地分布在全身，如钠，人们发现在所有器官有相同的浓度（大部分为NaCl），有些元素在体内则存在分布积累不均匀现象，而且变化较大。如磷存在每种细胞，构成体内的基本分子，但据计算，磷在动物软组织中的浓度为2—3mg/g，在骨组织中为40—130mg/g。

同一种元素通过不同的引入途径，在体内的分布是不同的，这是由于不同的引入途径，其吸收代谢速率不同所造成的，用^{32}P的实验可以很方便地得到证明。

三、材料与仪器

家鱼的幼鱼（体重约3—5g/尾），^{32}P溶液；

玻璃缸，烧杯、解剖用具，扭力天秤、塑料小管，微量进样器，G-M计数器。

四、实验步骤

1． 用微量进样器吸取1.48×10^{6}Bq的^{32}P溶液于适当的玻璃缸中，加水300ml，用玻璃棒搅拌均匀，贴上标签，吸取0.1ml水样于测量碟中烘干备测量用，放入4条幼鱼，经24h，取水样和幼鱼，进行解剖。

2． 用微量注射器吸取3.7×10^{4}Bq的^{32}P溶液，（约10μl以下）对幼鱼进行腹腔注射，然后放入无放射性的水中，24h取样。

3． 用塑料小管套于微量进样器，吸取^{32}P溶液3.7×10^{4}Bq/10μl左右，用手轻轻拨开小鱼的口腔，把塑料小管通过咽腔的咽齿插入食道，这时推动微量进样器，使^{32}P滴入食道中。稍待片刻，把鱼放入无放射性的水中，24h取样。

4． 取样：用尼龙小网分别取出三种小鱼，在水龙头冲

洗1min（边洗边翻动，使鱼的两侧面均得到冲洗），分别放入培养皿中滴入喹那啶，用吸水纸吸去鱼体表面水分，然后解剖，分为鳞，鳃、肌肉、内脏、骨骼5个部分（注意避免注射部位的污染），称取各部分器官组织各100mg于测量碟上，在G-M计数器进行放射性测量。

五、结果与分析

从实验结果分析^{32}P在鱼体器官组织中的分布情况及原因。

六、主要参考资料

［1］ 上海水产学院、山东海洋学院合编：鱼类生理学，40，农业出版社，1961。
［2］ 蔡仁逵等，应用放射性同位素研究鱼类的营养渗透，原子能科学技术，9：748—751，1963。
［3］ 立田穰等，Accumulation of Iron-59 in Marine Animals from Different Uptake Route, Bull. Japan, Soc. Sci. Fish., 50（1），89—93，1984.

实验十四　小白鼠心肌流量的测定

一、实验目的

1. 掌握对小白鼠进行尾静脉注射放射性核素的方法；
2. 应用^{86}Rb示踪法，测定不同药物，对小白鼠心肌流量的影响。

二、基本原理

试验证明，中草药心脉宁及潘生丁均能增加心肌营养性血流量。

应用放射性同位素^{86}Rb 作为示踪物，从动物的尾静脉引入体内，^{86}Rb随血液流入心脏后，被心肌摄取。若给试验动物引入增加心肌营养性血流量的药物后与对照组比较、心肌对^{86}Rb的摄取量应有增加。

^{86}Rb放出的β射线可以用探测器进行定量测定。

三、材料、仪器

小白鼠、体重15—20g，雌雄兼有。

G-M计数器，微量注射器，镊子，剪刀、吸水纸，扭力天平。

生理盐水，潘生丁，心脉宁。

标记化合物——^{86}RbCl。

四、实验步骤

1. 按小白鼠体重0.025ml/g剂量往每只小白鼠腹腔注入各种药物。

(1)0.9%生理盐水；

(2)0.4%潘生丁；

(3)5%心脉宁。

2. 上述药物注入小白鼠体内30min后，按小白鼠体重3.7×10^{2} Bq/g从尾静脉注入^{86}Rb 生理盐水 0.1ml。

3. ^{86}Rb生理盐水注入后30s，断头处死，并迅速开胸腔，取出心脏。将心脏纵向剪开，然后用生理盐水洗去心脏

内血液。取出，并用吸水纸吸去水分，剪碎，置于测量小碟内。

4. 用G-M计数射测量样品的放射性。

五、结果与分析

把不同药物对小白鼠心肌摄取^{86}Rb的计数率填入下表。

脉冲数 / 药物	脉冲/min				平均
0.9%生理盐水					
0.4%潘生丁					
5%心脉宁					

六、主要参考资料

[1] 中山大学生物系药用植物专业，同位素室等，^{86}Rb清除率在评价中草药对小白鼠营养性冠脉血流量中的应用，150—152页，1977。

[2] 李晓玉，丁光玉著，用^{86}铷稀释法在大鼠测定儿茶酚胺的一些血流动力效应，生理学报，27卷，第二期，103页，1964.

[3] 朱秀媛，李振华，用^{86}铷测定小鼠心肌营养性血流量的方法，中华医学杂志，第八期，559页，1975.

实验十五　用^{32}P测定磷素在植物体内的运转、分布和积累

一、实验目的

掌握用放射性核素^{32}P测定磷素在植物体内运转、分布、积累的方法和熟悉切伦科夫辐射的测量技术。

二、基本原理

磷是植物重要的营养元素之一，它易被植物吸收并在植物体内合成各种磷化合物，如核酸磷、蛋白磷、脂磷等；借助于放射性核素^{32}P可测定^{32}P进入植物体内的速率、分布、积累情况，本实验采用根施法，将^{32}P（$NaH_2^{32}PO_4$）引进植物体内，利用切伦科夫辐射测定^{32}P样品在植物体内的运转、分布。

三、材料仪器

实验材料：花生幼苗，^{32}P（$NaH_2^{32}PO_4$），Knop培养液。

培养箱，液体闪烁计数器，闪烁杯。

四、实验步骤

1．实验材料准备：花生种子在自来水中浸泡4h，转入有滤纸和少量水（约浸种子三分之一体积）的培养皿中，在27℃的培养箱中催芽，当胚根长至0.5cm时转入有石英砂的小塑料杯中，用培养液培养。

2．标记：将砂培杯内长到6叶期的花生幼苗小心拔出

（不要伤根），在自来水中冲洗干净，转入用Knop 培养液稀释的^{32}P（放射性比强度为9.25×10^{3}Bq/ml）中继续培养。

3． 取样：每隔1，2，5，7h取样一次，每次取3株，将根系中的^{32}P冲洗干净，每株分根、茎、叶，分别称鲜重。

4． 制样：将根、茎、叶用不锈钢剪充分剪碎，混合均匀，各称200mg，二个平行。

5． 测量：将样品分别投入闪烁瓶，再加入10ml蒸馏水，在液体闪烁计数器中进行切伦科夫辐射的测定。

五、结果与分析

1． 将结果记录于下表中

结果记录表

株别	取样时间	全株总放射性（cpm）	各器官放射性强度（cpm）								
			根			茎			叶		
			cpm/200mg	总强	%	cpm/200mg	总强	%	cpm/200mg	总强	%
1											
2											
3											

2． 计算植株各器官分布百分率。

3． 以放射性强度（cpm）为纵座标，以取样时间为横座标，在同一座标纸上表示根、茎、叶的分布曲线，比较^{32}P在根、茎、叶中不同时间取样的分布情况。

六、主要参考资料

[1] 中山大学生物系遗传学组、同位素实验室，作物“三系”生物学特征的研究 II、利用放射性同位素对不育系植株代谢障碍发生情况的研究，中山大学学报（自然科学版），2：17，1974。

[2] 陈舜华、林丽宽、李藻发，“切伦科夫辐射”在生物学示踪中的应用，中山大学学报（自然科学版），4：84—88，1980。

附： Knop培养液

1.	KH_2PO_4	2.5g
2.	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	10g
3.	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.5g
4.	KCl	1.2g
5.	$FeCl_3$	微量
6.	H_2O加至	1000ml

实验十六　用^{14}C测定光合作用强度

一、实验目的

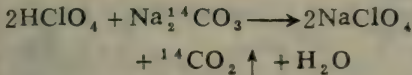
了解应用放射性核素^{14}C研究光合作用强度的操作方法。

二、基本原理

植物叶片置于含$^{14}CO_2$的密闭系统中，供以适宜浓度

（0.3—1%）的CO_2气体循环，在一定的光强和温度条件下，叶片进行光合作用。在短时间（若干 min）内，可借以测定单位重量叶片组织（或单位面积）同化的^{14}C产物的放射性强度，以表示光合作用的强度。

在密闭系统中，$^{14}CO_2$的产生，可用$Na_2^{14}CO_4$和高氯酸作用产生。



$$2HClO_4 + Na_2^{14}CO_3 \longrightarrow 2NaClO_4 + {}^{14}CO_2\uparrow + H_2O$$

在密闭系统中可用碱（NaOH）吸收回收$^{14}CO_2$。



$$^{14}CO_2 + 2NaOH \longrightarrow Na_2^{14}CO_3 + H_2O$$

密闭系统组成有如下几部分：

（1）玻璃光合叶室（其形状、大小和体积视不同植物叶片而定）。

（2）$^{14}CO_2$发生系统：其中瓶A为1 N的$HClO_4$ 8ml，瓶B为$Na_2^{14}CO_3$，瓶C为缓冲瓶。

（3）$^{14}CO_2$回收系统：其中瓶D为缓冲瓶，瓶E，F为NaOH溶液。

（4）橡皮泵或微型电动气泵。

以上各部分用橡胶管连接成为密闭系统，如下图：

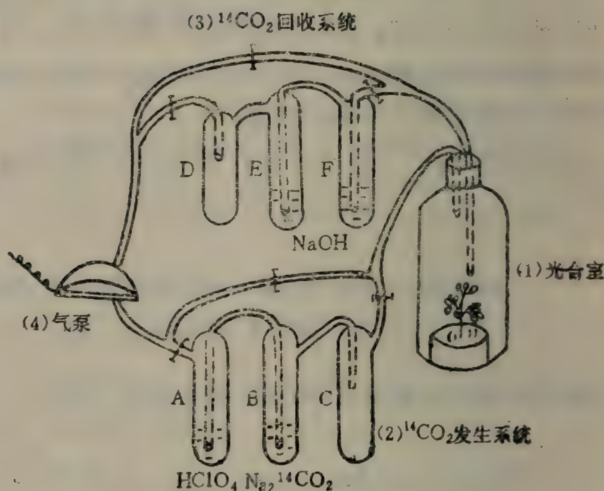


图16-1 利用^{14}C进行光合作用的装置

三、材料，仪器

$Na_2{}^{14}CO_3$，Na_2CO_3，$HClO_4$，NaOH;

玻璃叶室，反应瓶，回收瓶，橡皮泵或微型电气泵，烘干箱，G-M计数器。

四、实验步骤

1．把$^{14}CO_2$发生系统及回收系统按上图连接好。

2．根据密闭系统体积计算需要载体Na_2CO_3的重量，与放射性$Na_2{}^{14}CO_3$溶液混合在一起，置于反应瓶B内，放射性总强度为1.48×10^2 Bq。另一反应瓶A内装$HClO_4$。回收瓶E和F中装入NaOH溶液。连接好橡皮管。

3．将实验的两片叶片分别置入两个叶室（注意管口用

橡皮泥密封），其中一片完全光照，另一片作遮光处理。关闭$^{14}CO_2$发生及回收系统，靠支路橡胶管通气，启动气泵显示密闭系统气流畅通情况，检查每段管道有无漏气现象。

4．打开$^{14}CO_2$发生系统开关（此时关闭支路），启动气泵，使A瓶的$HClO_4$溶液进入B瓶的$Na_2^{14}CO_3$溶液中，产生$^{14}CO_2$，便计算光合作用的起始时间，经5 min后，关闭$^{14}CO_2$发生系统（同时打开支路），打开$^{14}CO_2$回收系统（关闭支路），继续启动气泵5 min，使多余的$^{14}CO_2$进入E，F瓶的NaOH溶液而回收。

5．将叶室取下，剪下实验叶片，置于烘干箱中105℃杀青10min，再转入80℃烘干，磨碎成均匀粉末样品，准确称取10mg（二个重复），盛于样品碟内铺平，用G–M计数器测量放射性强度，以cpm/mg/h表示叶片光合强度。

五、结果与分析

分别记录在完全光照和遮光处理下叶片的放射性强度，比较二者光合强度的差异。

六、主要参考资料

[1] A. A. 施勒克，研究叶绿素生物合成的示踪原子法，56—70，科学出版社，1961。

[2] 张明鹏、刘振声、丘泉发、陈舜华、林丽宽，应用同位素^{14}C和^{15}N研究再生稻光合产物分配和氮素营养吸收的生理效应，中国农业科学，3：1—5，1980。

[3] J. G. C. Small and O. A. Leonard, Translocation of ^{14}C-labeled photosynthate in nodulated legumes as influenced by nitrate nitrogen, Amer. J. Bot. 56(2): 187—194, 1969.

附：CO_2浓度计算方法举例。

叶室中的CO_2浓度一般控制在0.3—1%。

设密闭系统体积为2600ml，按 CO_2 的浓度为1%计算则：

$$2600ml \times 1\% = 26ml(0.026l)$$

在标准大气压下，1mol 体积为 22.4l，据此可计算出

$$1l\,CO_2\text{ 重量} = \frac{44}{22.4} = 1.98g$$

$$0.026l\text{ 的 }CO_2\text{ 重} = 0.026 \times 1.98 = 0.15g$$

$$\frac{44}{106} = \frac{0.15}{x}$$

$$x = \frac{0.15 \times 106}{44} = 0.36g(Na_2CO_3)$$

故按1%CO_2浓度计算共需非放射性 Na_2CO_3（载体）0.36g（$^{14}CO_2$重量很小，可忽略不计）。

实验十七　^{3}H-亮氨酸在甲壳类——沼虾（Macrobrachium nipponense De Haan）体内的代谢

一、实验目的

1. 了解氨基酸在沼虾体内的代谢情况。

2．掌握不同生物材料的消化溶解方法——液体闪烁测量的制样方法。

二、基本原理

甲壳类——（沼）虾需要摄取饵料中的蛋白质并在体内转化为氨基酸而吸收，也能在人工饵料中吸取所需要的氨基酸。本实验通过用标记的氨基酸溶解于水体或注射到虾胃中，经一定时间的代谢和运转到身体各部分的器官组织。定时取样测量，可了解^{3}H-氨基酸的代谢情况，样品要制备成为可供液体闪烁测量的液体状态。

甲壳类的外壳称为外骨骼，是一种复杂的有机物质，其外层为一层很薄的蜡质膜，其下是几丁质为含氮的多糖类，其分子结构式为：$(C_{32}H_{54}N_4O_{21})_n$以及蛋白质和钙等物质，这种物质较难溶解于一般的弱酸，能溶于高氯酸和硝酸的混合液，溶解并脱色后的消化液为清晰溶液。

三、材料与仪器

沼虾，^{3}H-亮氨酸或赖氨酸；

微量注射器，玻璃缸；

高氯酸，硝酸，过氧化氢，辛醇，喹那啶；

水浴锅，带塞试管，解剖用具。

闪烁液配方：

ppo2.75g，popop0.5g，甲苯333.5ml，Tritonx-100（或op-115）166.5ml。

液体闪烁计数器。

四、实验步骤

1. 选取健康活动力强的沼虾，每尾约 3 g 左右，经估算，注射 ^{3}H-亮氨酸2.96×10^{3}Bq/ 5 μl于虾胃，放入无放射性水体的培养缸中。

2. 加入一定量（7.4×10^{2}Bq/ml水）的 ^{3}H-亮氨酸于水体中，混匀后把健康活动力强的沼虾放入标记的水体中。

3. 把步骤 1 ， 2 处理的沼虾，在24h后取样，用尼龙网袋把虾取出，在活性水槽中冲洗 3 min，小心移入培养皿中，并滴入麻醉剂（喹那啶），然后放在瓷盘中，用吸水纸吸干其水分，解剖各种器官与组织。

4. 按顺序取出甲壳(从尾部取,尽量取远离头胸部的甲壳，避免注射部位的沾污）、肌肉、鳃丝、眼球、心肌、胃。分别称取鲜重（约100mg）于每个试管中。

5. 加入0.3ml高氯酸（70%）和0.3ml硝酸于上述各试管中，然后把试管置于70—80℃水浴中消化，待样品全部溶解后（约10min）加入$H_2O_2$1.5ml直至消化液清晰为止。

6. 每种样品的消化液各取出0.2ml于计数瓶中，加入闪烁液进行放射性测量。

7. 取两份等量的甲壳于另两支试管，分别加入0.6ml的高氯酸和0.6ml的硝酸（其他操作与 5 同），观察甲壳消化溶解情况。

五、结果与分析

讨论 ^{3}H-亮氨酸在沼虾体内的代谢分布特点。

六、主要参考资料

[1] 江静波等编著，无脊椎动物学，240—242，高等教育出版社，1965。

[2] 中国科学院生物物理研究所"液闪"编译组编译，液体闪烁计数及其在生物学中的应用，203—214，科学出版社，1979。

[3] W. Dall, Studies on the physiology of A Shrimp, metapenaeus sp. Aust. J. Mar. Freshw. Res, 16, 183, 1964.

实验十八 用^{32}P测定植物的磷代谢

一、实验目的

通过本实验，掌握应用放射性核素^{32}P示踪测定植物磷素代谢的实验方法。

二、基本原理

磷是植物重要的营养元素，在植物体内的活动性强，借助^{32}P示踪及各种溶剂的分离提取，可测定磷素进入植物体内的速率、分布以及植物体内的磷代谢过程。

三、材料，仪器

实验材料：车前草，5％三氯醋酸，乙醇，乙醚，丙酮，苯，异丁醇，Knop培养液，钼酸铵试剂（5 g钼酸铵溶于100ml10％H_2SO_4中），高氯酸（$HClO_4$），$MgCl_2$，KOH。

液体闪烁计数器，闪烁杯，培养箱，冰冻离心机，分液漏斗。

四、实验步骤

1．取生长健壮并有花枝的车前草，将根部置入含^{32}P的培养液中（^{32}P溶液的放射性比强度为9.25×10^{3}Bq/ml）培养，经不同时间（1，3，5h）后取样，剪取植物地上器官。

2．将车前草的叶和花分别剪碎，各称取鲜重200mg，放入有冰浴的玻璃研钵内，加入2ml 5%三氯醋酸，磨碎成匀浆，转入离心管内，在冰冻离心机中以3000转/min离心5—10min。

3．将上清液转入小烧杯中，加2ml丙酮，摇匀后，再加入1ml钼酸铵试剂，混合后放置5min。

4．用5ml异丁醇：苯＝1∶1并以水饱和的溶液萃取。先将步骤3中的溶液转入分液漏斗内，再加入异丁醇、苯混合液，强烈摇动，静止几分钟后，溶液分为明显的两层，下层为酸性有机磷化合物，上层为无机磷，分别收集两部分溶液于刻度试管中。

5．沉淀物先后用95%乙醇，乙醇：乙醚＝2∶1，乙醚各2毫升提取，离心，上清液为脂类磷化合物，将上述提取液收集于刻度试管内。

6．沉淀物用0.5N KOH水解18h（37℃±1），冷却，加少许$MgCl_2$，并以$HClO_4$酸化至pH＝1，离心，上清液为含^{32}P的核酸^{32}P-RNA。

7．沉淀用5%$HClO_4$在90℃水浴中提取15min，离心，上清液为^{32}P-DNA。

8. 上述各类（无机磷、酸性有机磷、脂磷、RNA、DNA等的^{32}P化合物）溶液，用蒸馏水定容至10ml，分别装入闪烁瓶。

9. 各类化合物（含^{32}P）样品，在液体闪烁计数器中进行切伦科夫辐射计数。

五、结果与分析

记录各类磷化合物的计数率（cpm），以各类磷化合物的总计数为100%，计算各类磷化合物各占的百分数，比较花、叶中不同时间取样各类磷化合物比例的变化情况。

六、主要参考资料

[1] 金子渔等，生物化学与生物物理学报，8: 1，35—47，1976。
[2] 赵玉桔，金成忠，植物根系的磷代谢及其对地上部分的作用，植物生理学报，1（1）: 141—151，1964。
[3] Joe H.Cherry, et al., Nucleic acid metabolism in peanut cotyledons, plant physiol, 40, 582—587, 1965.

实验十九　氧瓶燃烧法制备 ^{3}H，^{14}C标记的生物样品

一、实验目的

掌握氧瓶燃烧法，把^{3}H或^{14}C标记的生物样品转化为可供液体闪烁测量的液体样品。

二、实验原理

放射性同位素标记的生物材料种类繁多，结构和成份较为复杂，通过用酸或碱的方法仍不能把固体样品消化为液体，或者因为颜色不能去除等原因而影响了测量结果。因此必须通过彻底氧化为相应的氧化物，（同一种的化学形式和同一的颜色）再用各种方法吸收然后在闪烁液中进行测量。对^{3}H所标记的样品，燃烧后再加入无水乙醇并置于冷井中使成为氚水，对^{14}C的样品，燃烧后成为$^{14}CO_2$，置冰浴上，再用乙醇胺或苯乙胺等有机碱吸收成为液体，这样就能在闪烁液中对不同组织器官的^{3}H或^{14}C样品进行测量比较，并能避免颜色的淬灭影响。

氧瓶燃烧法制备^{3}H和^{14}C的生物样品，国内外有许多报道，进行了各种改进和设计，本实验是根据氧瓶燃烧法的原

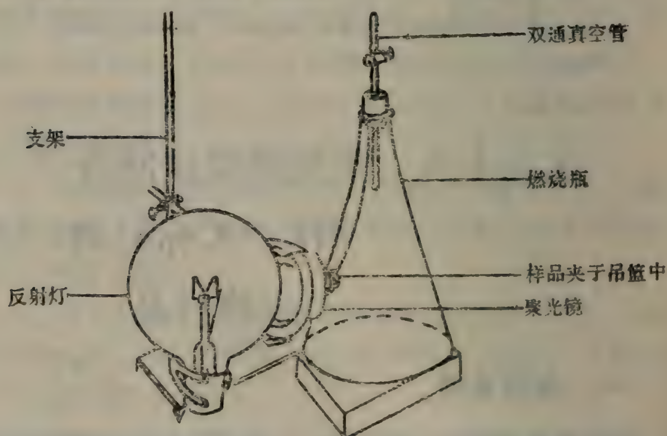


图19-1　氧瓶燃烧法——聚光点火装置



图19-2　氧瓶燃烧法——电火花点火装置

理，参考有关文献资料而设计的一种简易的聚光点火燃烧法，其装置如图。

其他还有应用高频电火花真空检验器产生尖端放电而使燃烧瓶内样品燃烧。这种方法因为操作较为简便也常被应用。

三、材料，仪器

^{3}H，^{14}C标记的植物样品，无水乙醇，乙醇胺，闪烁剂：甲苯、二氧六环等所配制的闪烁液；

聚光镜，反射灯（300瓦），GG-17或九五玻璃制的三角烧瓶（500ml），氧气钢瓶；

高频电火花真空检验器。

四、实验步骤

1．称样：准确称取^3H或^{14}C标记的待测样品10mg各2个，每个样品用已染蓝墨水之擦镜纸包成一小包。

2．装样：把称好之样品包夹入样品吊篮中，样品吊篮是用长约15—20cm电炉丝扭成连续螺纹，作成一个小篮状，另一端拉成直线插入燃烧瓶塞底部，橡皮塞中央穿过一支带活塞的玻璃连通管。

3．充氧气：打开燃烧瓶的橡皮塞，向瓶内充氧气一min，（氧气的流量控制在浮锥上升至5的刻度）然后塞紧橡皮塞或加熔蜡于瓶口与橡皮塞的接口处。

4．点火燃烧：开亮反射灯，使聚光镜聚焦于燃烧瓶内的样品包上，即能着燃。若使用高频电火花真空检验器时，接通电源把电火花对准燃烧瓶内的样品包（停留时间不能超过5s、防止击穿玻璃瓶）。

5．冷却：把已燃烧完毕的燃烧瓶放入冷井或冰浴中，约15—20min，使气体下沉。

6．加入吸收液：用无水乙醇或乙醇胺从连通管注入（打开活塞）燃烧瓶内并摇动使吸收液与气体充分混合，吸收放置20—30min。

7．用9ml^3H或^{14}C之闪烁液分三次淋洗^3H或^{14}C之燃烧瓶，每次淋洗液装入计数瓶。

8．用^3H或^{14}C之测量条件，测量实验样品。

五、结果与分析

从实验结果，分析测量样品产生误差的原因，并比较两种燃烧方法的优缺点。

六、主要参考资料

[1] 中国医学科学院第七研究室主编，同位素技术及其在生物医学中的应用，32—34，科学出版社，1977。

[2] 唐希灿等，生物样品中^{14}C的氧瓶燃烧测定法，《生物化学与生物物理进展》，5，69—72，1979。

[3] 陈舜华、林丽宽，制备^{14}C生物样品的一种简易燃烧测定法，中山大学学报，4，136—138，1982。

实验二十　氧瓶燃烧测定法中最佳条件的选择及回收率的测定

一、实验目的

1．选择吸收液的最适体积，
2．放射性（^{3}H或^{14}C）回收率的测定方法。

二、实验原理

用^{3}H或^{14}C标记的生物样品，放在充满氧气的密闭燃烧瓶中点火燃烧，燃烧后的气体用吸收剂吸收，从而转化为液体，因此吸收液的体积大小直接影响计数效率，若体积太大增加淬灭，体积太小，气体吸收不完全，因此样品制备前必须进行一系列的预备试验，选择出吸收液的最适体积，使能获得较高的计数效率。

为了检验被测样品的回收率，一般是通过外加标记物来实现的。外加的方法是用不同量的标记物加在小滤纸片上，

干燥后燃烧。另外将标记物直接加入闪烁瓶中进行测量，把通过燃烧步骤所测得的数值和它比较，求得放射性回收的百分率。燃烧过程中使用的吸收液造成的淬灭和燃烧中淋洗液转移的损失，可用下列步骤求得相对计数效率E进行校正：即把一定量的标记样品进行燃烧，测得放射性活度N_1，滴入外加标记物后测得放射性活度为N_2，把N_2-N_1除以N_3（即外加标记物直接在闪烁液中测量的数值）乘以100%即为相对效率：

$$E=\frac{N_2-N_1}{N_3}\times 100\% \qquad (A)$$

在回收实验中，测得外加物经燃烧的放射性后，用所求出之E加以校正，然后除以在闪烁液中直接测量之数值，即：

$$\text{回收率}=\frac{\frac{\text{外加标记物燃烧}}{E}}{\text{外加标记物直接加入闪烁液中}}\times 100\% \qquad (B)$$

三、材料及仪器

^3H标记的植物样品，^{14}C标记的植物样品，^3H-胸腺嘧啶核苷，^{14}C-葡萄糖，无水乙醇，乙醇胺，闪烁体，二氧六环、甲苯。

液体闪烁计数器，聚光镜，反射灯300瓦，高频电火花真空检验器，氧气钢瓶，500ml的九五三角烧瓶（或GG-17）。

四、实验步骤

1. 燃烧装置及过程与实验十九的步骤相同。

2. 以不同体积的吸收液（无水乙醇、乙醇胺）和同一重量的样品进行比较。

3. 以不同体积的吸收液和不同重量的样品进行比较。

4. 求出氧瓶燃烧测定法对 ^{3}H 标记的样品和 ^{14}C 标记的植物样品的回收率。

表20-1

吸收液之体积(ml) / cpm	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4
样品重量 10mg								

表20-2

样品重量(mg) / cpm / 吸收液体积（ml）	10	20	30	40
1				
2				
3				
4				

（1）取10mg ^3H-植物样品进行燃烧测得cpm值为N_1（此闪烁瓶的瓶号为A）；

（2）加入一定量的^3H-TdR于a瓶中进行放射性测量，其cpm值为N_2；

（3）取与（2）等量的^3H-TdR于闪烁瓶b中，加入闪烁液直接测量其放射性的cpm为N_3；

以上三项测得的数据代入（A）式求出E。

（4）取与（2）等量的^3H-TdR滴于小滤纸片上，凉干燃烧所得数据用E校正，与（3）所测得的cpm值进行比较，代入（B）式便可求回收百分率；

以上每种数据需要三个以上的平行样品。

（5）另取^{14}C标记的植物样品，其燃烧步骤与^3H样品的方法相同，唯^{14}C标记的样品燃烧的气体用乙醇胺吸收。外加物用^{14}C-葡萄糖。

五、结果与分析

从实验结果确定吸收液的最佳体积并求出本实验方法的回收率，提出注意事项，分析误差原因。

六、主要参考资料

［1］中国科学院上海生化所五室代谢组：氧瓶燃烧法制备^3H生物样品，《生物化学与生物物理进展》，2，66—69，1979。

［2］R. G. Kelly, et al., Determination of ^{14}C and ^3H in Biological Samples by Schöniger combustion and Liquid scintillation Techniqes, 2, 268—280, 1961.

实验二十一　用^{32}P或^{51}Cr标记红血球

一、实验目的

1．掌握红血球的标记方法。

2．了解"切伦科夫辐射"技术对生物示踪样品测量的特点。

3．比较^{32}P和^{51}Cr对红血球的标记效率。

二、实验原理

^{32}P可用于标记红血球，因为磷是组成红血球的成份之一，当^{32}P进入红血球以后与非放射性磷酸根离子一起，迅速地参与磷酸化作用。在新生成的磷酸酯分子中即含有^{32}P，因而红细胞便受到了标记。^{32}P放出β射线，能量为1.71 MeV，可用G-M计数器进行测量，也可应用"切伦科夫辐射"的原理，以水为介质，在液体闪烁计数器中，测量^{32}P的放射性。使^{51}Cr标记红细胞是因为^{51}Cr是以$^{51}CrO_4^{2-}$的六价铬扩散进入细胞膜内，还原为三价铬，与红细胞的血红蛋白结合十分稳定。^{51}Cr广泛地用于临床上，用于测量人的红细胞的寿命及血容量等等。^{51}Cr放出的γ射线的能量为0.32 MeV，可在井型闪烁计数器中测量其放射性。

三、材料与仪器

动物血液，$Na_2H^{32}PO_4$及$Na_2{}^{51}CrO_4$，3.8%柠檬酸钠溶液，生理盐水（0.9%），甲酸、过氧化氢、辛醇；

离心管，胶头吸管，微量进样器，试管，水浴锅，离心机，液体闪烁计数器，γ井型闪烁计数器。

四、实验步骤

1. 动物血的准备：家兔（或葵鼠）一只，采用心脏穿刺取血（注意：取血之注射器必须预先加入一定量的抗凝剂），把血液置于小三角烧瓶内备用。

2. 取 $Na_2H^{32}PO_4$若干μl（3.7×10^4 Bq/ml 血液）置于一个小三角烧瓶内，并用0.1ml生理盐水加以稀释，按量加入抗凝剂。轻轻摇匀，加塞子，然后置于37℃的水浴锅中温育30min（每隔15min摇动一次）。孵育结束后，取出1ml的放射性血液于10ml有刻度的离心管中，吸取0.2ml血液于另一试管备用，剩余的0.8ml用记号笔在试管外划下液面高度然后在2000—2500转/min的离心机中分离血清及血球，小心弃去上清，然后用生理盐水洗涤三次（每次用8—9ml的生理盐水洗涤。）

为了检查红血球的洗涤是否干净，可取出最后一次洗涤液（部分）进行放射性测量，若接近本底水平，则红血球的洗涤便可结束（否则还要继续洗涤）。吸去上清液，把已洗涤干净的红血球用生理盐水稀释至原血液体积的刻度，摇匀，取至0.2ml作测量标记的红血球。

3. ^{32}P标记的血液的消化：血液样品在测量之前，需要进行消化处理，消化的方法是用0.2ml的全血及0.2ml血球悬液，各加入甲酸0.6ml、过氧化氢0.6ml、1滴辛醇，在60—70℃水浴上消化约10—15min至溶液基本无色为止。

4. 样品的放射性测量：取上述消化液100μl于闪烁瓶中，加入10ml蒸馏水，测量全血及标记的红血球的放射性。另取

0.2ml标记的红血球悬液，加入蒸馏水1.2ml，使红血球溶血而呈红色，同样取出100（或200）μl加水10ml于闪烁瓶内，测量放射性，与经消化的标记红血球样品作比较。

5. 用^{51}Cr 标记红血球，按步骤 2 的操作，但经^{51}Cr 标记的血液及血球样品，不需要消化，直接取出全血及经洗涤的标记红血球各 0.2ml 于玻璃小试管中，置于井型 γ—闪烁计数器测量其放射性。

五、结果与分析

求出^{32}P和^{51}Cr 标记红血球的标记效率（可按公式：

$$\frac{\text{标记红血球之 cpm}}{\text{标记全血之cpm}}\times 100\text{求出}\%\Big)。$$

六、主要参考资料

[1] Е. И. Воробьев 著、张友尚等译，放射性同位素在医学和生物学中的应用，239—241，人民卫生出版社，1957。

[2] Gray J, et al., The Tagging of Red Cells and Plasma Proteins With Radioactive Chromium, J. Clin. Invest, 29, 1604, 1950.

实验二十二　用^{51}Cr标记红细胞（红血球）测定红细胞和血液的体积

一、实验目的

1. 通过本实验了解同位素稀释法的原理。

2. 掌握应用示踪原子测定一种动物红细胞的体积和血液总体积的方法。

二、实验原理

1950年格雷（Cray）等证明了$Na_2{}^{51}CrO_4$的^{51}Cr能用以标记红细胞，因为正常人及动物血液红细胞中含有微量的铬，同时阴离子中的六价铬的形式对红细胞有显著的亲和力，它通过细胞膜后还原为三价铬与血红蛋白相结合，而使红细胞被^{51}Cr牢固的标记。因此应用六价的铬酸盐离子与血液进行孵育。经离心机分离出标记的红细胞，根据稀释法的原理，给动物体注射一已知量的标记红细胞，经一定时间，待这些红细胞与体内的血液充分混合，抽取一定量的血样，测定其稀释度。通过计算，可测知红细胞容量，然后再由红细胞压积数换算出全血容量。下列符号包括用于红细胞体积的计算：

V_c = 红细胞的总体积，

V_i = 注射标记红细胞的体积，

C_i = 注射标记红细胞的放射性比活度（cpm/ml），

C_r = 回收（经循环后抽取的）的标记红细胞放射性比强度（cpm/ml），

V_B = 血液总体积，

H = 红细胞压积数。

根据稀释法的原理，应用下式（A）可求出红细胞的体积。

$$V_c = V_i \times \frac{C_i}{C_r} \cdots\cdots \quad (A)$$

再从红细胞的体积除以红细胞之压积（H）即为血液总体积：

$$V_B = \frac{V_c}{H} \cdots\cdots \quad (B)$$

例如：猫的血液在压积管的刻度为1.05ml、经离心后为0.41ml，这两者之比值乘上较正系数（0.96）即得H。

$$\therefore H = \frac{0.41}{1.05} \times 0.96$$
$$= 0.37$$

三、材料，仪器

猫或兔；

^{51}Cr （$Na_2{}^{51}CrO_4$），肝素溶液，巴比妥钠，生理盐水；

三路开关，注射器，三角烧瓶，红细胞压积管，测量小管，离心机，离心管；

γ井型闪烁计数器。

四、实验步骤

1. 猫的麻醉和解剖：用4.5%戊巴比妥钠或异戊巴比妥钠以2.5ml/kg腹腔注射，把猫固定在手术台上。解剖下肢一侧，使露出股静脉，插入一个三路开关。解剖颈部，分离出颈动脉，插入两个塑料小管，从这两个管的末端引出一个回路，在回路中间装上一个三路开关，检查血液是否已流通。在股静脉的三路开关处注入肝素（1:1000单位）2.5ml，经循环至全身。在颈动脉回路三路开关处取猫血10ml，留2ml作红细胞压积数的测定。

2. 血球的标记：把^{51}Cr（按3.7×10^4Bq/ml 血液）预先用小量生盐水稀释，然后加入8ml 猫血摇匀，在37℃水浴锅中孵育，每隔 10—15min 摇动一次使血液与^{51}Cr均匀混合，经45min孵育结束。取1ml作为标准源，测定其放射性，划下此管的液面记号。剩余的血液也记下液面记号。两管均进行离心（离心机转速为2000—2500转/min），离心15min，去血浆，并用生理盐水洗涤至上清为本底水平，用生理盐水恢复至原来体积，测定标准源标记血球的放射性。

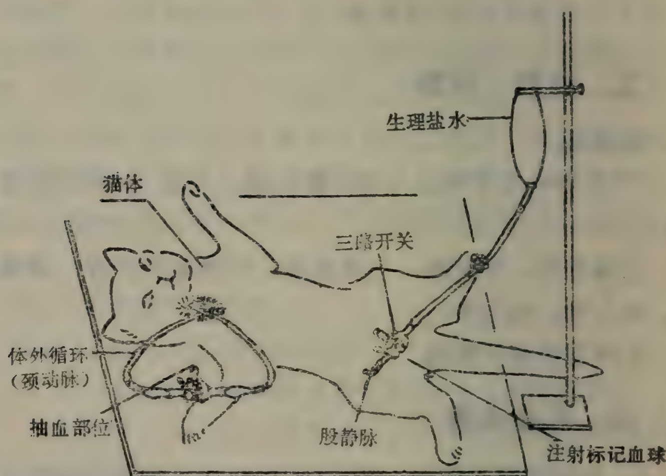


图22-1　猫的解剖，表示股静脉及颈动脉

3. 注射标记血球：把标记的血球（5—6ml）从股静脉注入，记录注射时间和注入量。

4. 抽取循环血：于注射后30及45min后各取2ml 血液，其中1ml作为经猫体循环稀释后血液的放射性，剩余1ml作稀

释后的血球压积数的测定。

五、结果

1. 计算^{51}Cr对红细胞的标记效率，

2. 从实验结果计算猫红细胞及全血容量，按猫的血容量为6.2%计算，用本实验方法所得是否与此接近?

六、主要参考资料

[1] 陈可靖等，应用^{51}Cr 测定血容量，原子能科学技术，11，1266—1270，1964。

[2] 江静波、陈舜华、梁东升、林丽宽等，铬-51标记的人红血细胞在弥猴体内的消失速率，中山大学学报 3，120—122，1981。

[3] Internationl Atomic Energy Agency, Vienna, Laboratory Training Manual on the use of Isotopes and Radiation in Animal Research, 120—126, 1966.

实验二十三 用^{35}S测定种子萌发时的蛋白质代谢

一、实验目的

掌握用放射性核素^{35}S 测定植物胚轴和子叶中蛋白质代谢的基本方法。

二、基本原理

硫是蛋白质组成的重要元素之一，利用放射性核素^{35}S

标记正在萌发的种子，硫能参与植物体内蛋白质的合成，通过用三氯乙酸沉淀，再测定沉淀物中的放射性，以了解蛋白质的代谢动态。

三、材料，仪器

蚕豆种子，^{35}S-蛋氨酸，三氯乙酸，乙醇，乙醚。

恒温培养箱，离心机，G-M计数器。

四、实验步骤

1．浸种萌发：将蚕豆种子放入水中浸种4h，后转入底部有滤纸的培养皿，在27℃的培养箱中催芽。

2．标记：将萌发1天（包括浸种4h在内）、1.5天、2天、3天的蚕豆种子分别移入含^{35}S-蛋氨酸的培养液中培养3h，放射性比活度为7.4×10^{4} Bq/ml。

3．将种子在自来水中冲洗10min，小心剥下胚轴。

4．将每组的一部分胚轴和子叶在80℃下烘干至恒重，磨碎，称取20mg置于样品碟中，用G-M计数器直接测量样品的放射性活度（cpm）。

5．将每组的另一部分胚轴和子叶分离，提取蛋白质。

（1）从每组称取鲜重200mg的样品，置于玻璃研钵（研钵置于冰浴上）中，加入10%三氯乙酸4ml（包括洗研钵的量），研碎成为匀浆，转入5ml的离心管中，在3000转/min的离心机中离心5min。

（2）沉淀物加4ml5%的三氯乙酸，搅匀，离心，共三次。

（3）沉淀物用1:1和1:3的乙醇:乙醚洗两次，离心。

（4）沉淀物再用乙醚洗一次，离心。

（5）沉淀物在68℃的烘箱中干燥至恒重，研成粉末，在G-M计数管下测定样品的放射性活度（cpm）。

五、结果与分析

以测定的放射性活度（cpm）为纵座标，以萌发的时间为横座标作图，比较蚕豆种子在萌发过程胚轴和子叶中^{35}S-蛋白质含量的变化。

六、主要参考资料

［1］中国科学院上海植物生理研究所细胞室编译，植物组织和细胞培养，56—57，上海科学技术出版社，1978。

［2］朱寿彭，两种巴比妥类催眠药对机体组织蛋白中^{35}S-蛋氨酸摄取量的影响，生物化学与生物物理学报，5（2），1965。

［3］Kylin, A., The inflnence of phosphate nutrition on growth and sulphur metabolism of seenedesmus, 17（2），384—402，1964.

实验二十四　用^{32}P测定小白鼠肝脏组织的^{32}P-DNA和^{32}P-RNA

一、实验目的

学习从小白鼠组织中分离^{32}P-DNA和^{32}P-RNA的方法。

二、基本原理

核酸和蛋白质是构成生物有机体必不可少的组成成分。利用放射性同位素^{3}H-胸腺嘧啶核苷（DNA的前体物质）；^{3}H-尿嘧啶核苷（RNA的前体 物质）或 $NaH_2{}^{32}PO_4$ 等均能进行示踪试验。用^{32}P 来标 记 动物，分离出 来的，是^{32}P-DNA和^{32}P-RNA。但根据磷含量，可以计算出核酸的量。（RNA含磷量为9.5%，DNA含磷量为9.9%）。

对核酸的分离，本实 验采 用旋 密特-撒哈译-昔莱德法（Schmidt-Thannhauser-Schneider），简 称 STS 法，略加修改。

三、材料，仪器

1．20%三氯醋酸（TCA）；
2．10%三氯醋酸（TCA）；
3．6N HCl；
4．0.1N HCl；
5．0.3N KOH；
6．甲醇，氯仿，乙醚；
7．5%$HClO_4$（7.1ml70%$HClO_4$加蒸馏水 92.9ml）；
8．核素——$NaH^{32}PO_4$；
10．液体闪烁计数器；
11．玻璃匀浆器或乳钵；
12．冷冻离心机、水浴锅等。

四、实验步骤

1．用微量注射器吸取^{32}P 溶液（按小白 鼠 体 重 3.7×

10^4 Bq 的量计算）尾静脉或腹腔注入小白鼠体内，然后放回笼中喂养 24h 后取样。

2. 取样：用断头法把小白鼠杀死，迅速取出肝脏，称重，再用冷蒸馏水把肝脏冲洗干净，最后放入预冷乳钵中研磨。具体流程如下：

肝脏组织 1 g

在水浴中用匀浆器或乳钵研磨成浆加冷蒸馏水 5 ml+20% TCA 5 ml 搅匀，0℃离心，3000转/min，10min。

上清液　沉淀物+冷 10% TCA10ml 搅匀，0℃离心，3000转/min，10min。

上清液　沉淀物+冷蒸馏水 1 ml搅匀，再慢慢加入冷无水乙醇 9 ml，搅匀，0℃离心，3000转/min，10min。

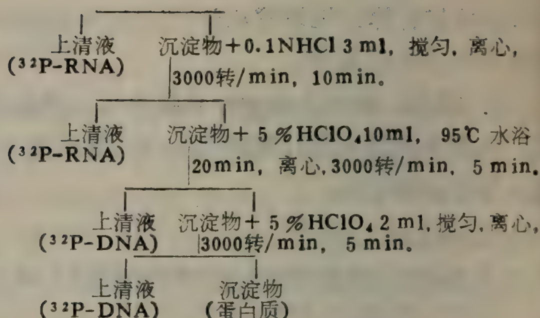
上清液　沉淀物+冷无水乙醇10ml，搅匀，0℃离心，3000 转/min，10min。

上清液　沉淀物+氯仿:甲醇（2:1）搅匀，离心，3000转/min，10min。重复一次。

上清液　沉淀物+乙醚10ml搅匀，离心，3000转/min，10min

上清液　沉淀物放30—40℃水浴中片刻，利用此时间把左边上清液放置液体闪烁器计数，应是本底水平，否则沉淀物应加入蒸馏水 10ml，搅匀，离心，3000转/min，10min。直至洗涤液接近本底水平为止。

上清液　沉淀物+0.3NKOH10ml在匀浆器研磨后，37℃保温1.5—2h，后加入6 NHCl 2 ml，搅匀，离心，3000转/min，15min。



3．把上述^{32}P-RNA 和^{32}P-DNA 溶液全部移入闪烁测量瓶中。在液体闪烁计数器中，进行切伦科夫计数法测量。

五、结果与分析

1．实验结果填入下表

样品 \ 测量数	样品放射性cpm		平均cpm
	1	2	
本　底			
^{32}P-RNA			
^{32}P-DNA			

2．注意事项

（1）提取^{32}P-RNA溶液前的上清液，一定要洗至本底水平，否则^{32}P-RNA 将会受到^{32}P 的污染而使数据不准确。

（2）细胞破碎要彻底，否则细胞内的DNA 和RNA 很

难以抽提或抽提不完全。

六、主要参考资料

[1] 朱俭等，生物化学实验，133—136，上海科学技术出版社，1981年。

[2] A.M.库津著，农业研究中的示踪原子，68，科学出版社，1956。

[3] B.H.奥烈霍维奇等著，示踪原子法和蛋白质代谢问题，87，科学出版社，1957。

实验二十五 利用示踪原子研究辐射对花生胚轴DNA合成的影响

一、实验目的

通过实验使学生掌握分离、测定 水解 DNA 的方法，从而了解辐射对生物体细胞大分子核酸合成的影响。

二、基本原理

^{60}Co-γ射线能引起种胚生物细胞内部结构（细胞的或分子的）的变化，乃至遗传性的改变(基因突变)。特别是射线对于生物 DNA 合成的影响尤为显著。利用放射 性同位素标记化合物 DNA的前体物^{3}H-胸腺嘧啶核苷（^{3}H-TdR），可以用生物化学方法分离提取 DNA 组分进行放射 性测量，或放射自显影技术研究辐射对 DNA 合成率 的影响。

三、材料，仪器

1. 0.2N $HClO_4$（6ml70%$HClO_4$加水至500ml）；
2. 0.5N $HClO_4$（15ml 70%$HClO_4$加水至500ml）；
3. 0.5N KOH；
4. 甲醇；
5. 乙醇；
6. 乙醚；
7. 二氧六环闪烁剂：

POPOP1,4-双-2-（5-苯基噁唑基-2）苯　0.4g

PPO（2，5-二苯基噁唑）　3g

萘　110g

二氧六环至　1000ml。

8. 液体闪烁计数器；
9. 冷冻离心机；
10. 电热恒温水浴箱；
11. 乳钵；
12. 各种离心管，量筒，玻棒等。

四、实验步骤

1. 浸种萌发：辐射前3—5天，把花生放入底部有滤纸的培养皿中，在培养箱中27℃下，催芽，浸种时要经常换水。

2. γ射线处理：照射剂量为0，0.5，3，10万伦。

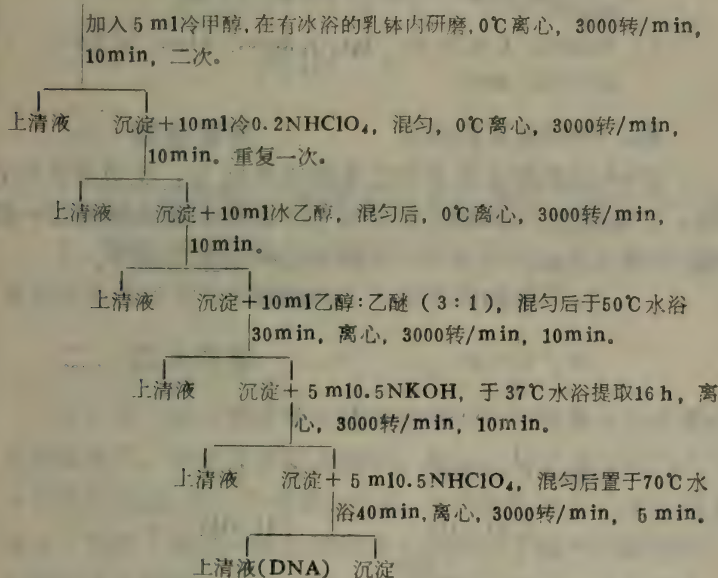
3. 将种子小心剥下胚轴（完整不破裂）。

4. 标记：将四组胚轴（每组10个）分别放进含^3H-TdR

的Knop培养液中培养3h，放射性比度为5μCi/ml。

5．将胚轴冲洗干净，移入培养皿中继续培养0，3，10，16，24h后分别取样。

6．分离提取水解DNA组分，具体流程如下：



（8）把 DNA 注入闪烁瓶中，再加入 9ml 二氧六环闪烁剂，摇匀，在液体闪烁计数器中测定放射性活度。

五、结果与分析

1．将测定数据列表。

2．以时间为横坐标，放射性强度（cpm）为纵坐标，将不同剂量处理后不同时间取样的结果作坐标图，进行比较。

分析辐射对 DNA 合成率的影响。

六、主要参考资料

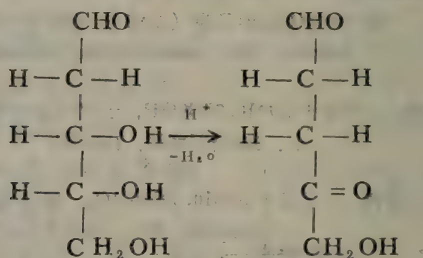
[1] J.H.彻里，植物分子生物学实验指导，科学出版社，78—82年。

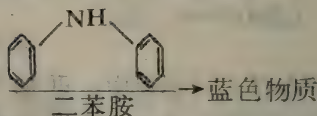
[2]丘泉发，刘振声，李宝健，罗进贤等，γ辐射引起花生和水稻种胚非按时DNA合成效应的研究，遗传学报，11（5），361—367，1984年。

[3] Gudkov, I.N.et al., Int. J.Radat. Biol., 29（5）: 455—462, 1976.

附： DNA的定性检定

DNA 在酸性条件下和二苯胺加热反应，生成蓝色化合物，这是因为 DNA嘌呤核苷酸上的脱氧核糖遇酸生成w-羟基-r-酮基戊醛，它再与二苯胺作用产生蓝色物质。





脱氧核酸　　w-羟基-r-酮基戊醛

此法受多糖及其衍生物和蛋白质的干扰。

二苯胺试剂的配制：

称取二苯胺一克溶于100ml 冰醋酸中，再加入2.75ml 浓硫酸（在冰箱中可保存 6 个月，使用前室温摇匀）。

实验二十六　用凝胶过滤法分离血清中与蛋白质结合的^{125}I及游离的^{125}I

一、实验目的

1．学习和掌握分子筛凝胶过滤的原理和基本操作技术。

2．掌握^{125}I标记血清蛋白的基本方法，以及凝胶过滤法分离血清中蛋白质结合的^{125}I与游离的^{125}I。

二、实验原理

分子通过膜（如玻璃纸或胶棉等）的扩散率与分子量的大小成反比。根据透析技术得知，较小的分子通过膜比大的分子更为迅速。膜的作用像分子筛，根据膜孔的大小允许分子通过，当分子通过一种已知规格大小的分子筛——凝胶时，小分子进入凝胶比大分子快。如果把凝胶装在一个长柱上，当含有大分子和小分子混合物的样品加入柱内后，这些物质便会随着洗脱液的流动而前进，较大的分子比那些吸附在凝胶的小分子先排出柱外，大分子流速快，而小分子流速慢，这样便可达到把大小两种分子量的物质分离的目的。

应用$Na^{125}I$在强氧化剂作用下，使离子状态的$^{125}I^-$转变为分子状态的^{125}I，这样便能结合到血清蛋白质酪氨酸的残基上。

在一定的pH值的缓冲液浓度并控制洗脱液的流速等的条件下，可以把人的血清分离。

三、材料，仪器

1．$Na^{125}I$源液；

2．健康人血清；

3．0.5M磷酸缓冲液，$KH_2PO_4$0.84g，$Na_2HPO_4$6.3g，用无离子水配制成100ml溶液，pH7.5

0.05M磷酸缓冲液：

把0.5M磷酸缓冲液稀释成0.05M；

4．氯胺T溶液：氯胺T25mg加入0.05M磷酸缓冲液5ml；

5．偏重亚硫酸钠溶液：偏重亚流酸钠60mg加入0.05M磷酸缓冲液5ml，配成1.2%的浓度；

6．碘化钾溶液：KI50mg加入0.05M磷酸缓冲液5ml配成1%之浓度；

7．过滤柱：为一双通玻璃管（φ1.1×20cm）并进行硅烷化处理；

8．胶塞（中心穿过注射针头，针尖朝外）；

9．小塑料管，螺旋夹，止血夹；

10．葡聚糖凝胶（Sephadex G-50）；

11．测量小试管；

12．定标器连接井型γ-闪烁探头。

四、实验步骤

1．标记柱的制备：

（1）凝胶的预处理：实验前需将凝胶颗粒在磷酸缓冲

液中膨胀，经一定时间才能上柱。本实验取 Sephadex G-50 2g，加入 0.05M 磷酸缓冲液 40ml，在加入溶液时用玻棒搅动，避免颗粒聚集，放入冰箱过夜备用，或至少放置 6 小时，装柱前倾泻去上清液及悬浮的小颗粒杂质。

（2）装柱：用一支 φ1.1×20cm 的玻璃管，其一端用一个正中打好孔的橡皮塞塞紧，使可穿过一枚注射针头。针头平面与胶塞底面同在一个水平面，针尖套一大小合适的塑料小管（约 5cm），取经磷酸缓冲液泡浸过的小量玻璃棉铺于胶塞上面，以防Sephadex G-50 阻塞针孔，将玻璃管垂直固定在铁架上，在塑料管外套上一个小螺旋夹，末端再夹以止血夹，将已经膨胀之Sephadex G-50 沿着小玻棒徐徐地一次加入过滤柱内，大约15—17cm的高度。把上清液吸去，或松开出口处，并调节流速约为 1ml/2.5min，去除上清液后（表面保留2—3mm溶液）关闭出口处。

2. 血清的标记及加样与过滤液的收集：

（1）用微量吸液管吸取 $Na^{125}I$ 于盛有 0.1ml0.5M 磷酸缓冲液之反应小管内，轻轻摇动（^{125}I 用量约为 4.44×10^{6} Bq/ml 血清）测量总计数；

（2）把人血清 1ml 移入反应管中，小心摇动使均匀混合；

（3）加入新配制的氯氨T50μl（250μg），马上用胶塞塞紧反应管，小心摇动，作用 3min后，加入1.2%偏重亚硫酸50μl，终止反应，然后加入1%KI溶液100μl；

（4）把这些碘化反应之血清样品小心加到已准备好的Sephadex G-50柱上，再用少量KI溶液冲洗反应小管并加入柱内（测量存留于反应管的放射性），在柱的顶部加入一块大于过滤柱直径的滤纸片（不接触液面），使加溶液时不打

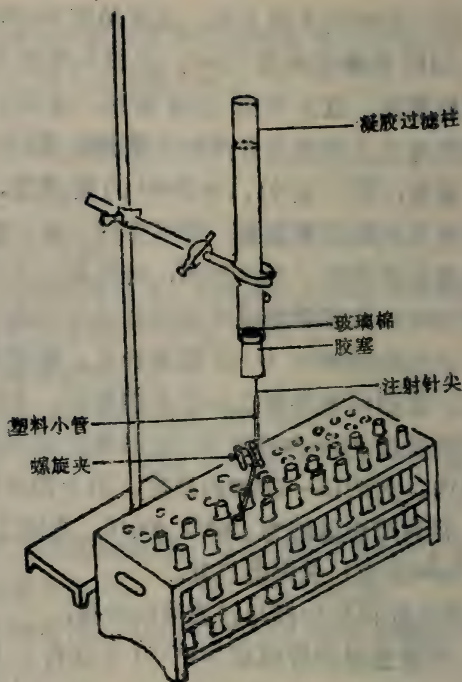


图26-1　凝胶过滤柱的装置

乱凝胶表面。打开止血夹，开始收集过滤液，待样品进入凝胶后用0.05M磷酸缓冲液进行洗脱。收集25管，每管1ml。以上（1）—（4）均在铅玻璃防护屏后面进行操作。

3. 放射性测量：

把所收集的部分放在γ井型闪烁计数器中，测量其放射性，注意波峰出现的管号。

4. 计算：

根据实验结果，用下式计算^{125}I标记血清蛋白的百分率，即：

$$\frac{\text{总计数}-\text{存留于小管计数}-\text{无机}^{125}\text{I波峰计数}}{\text{总计数}-\text{存留于小管计数}}\times 100$$

五、结果与分析

计算^{125}I标记血清蛋白的百分率，以管号为横座标，计数率为纵座标作图。分析图中第一与第二波峰的放射性是否与实验原理所述相符？

六、主要参考资料

[1] 鲁子贤，凝胶过滤法测定蛋白质的分子量，《生物化学与生物物理进展》，1，42—49，1974。

[2] 厦门水产学院鱼类生殖生理科研小组，中国科学院上海生化所多肽激素组，鲤鱼（Cyprinus Carpio L.）血清促性腺激素的放射免疫测定，《生物化学与生物物理》，10，（4）399—407，1978。

[3] 张龙翔等，生化实验方法和技术，124，高等教育出版社，1984。

[4] Green wood, F.C.and Hunter, W.M., The preparation of ^{131}I-Labelled human growth hormone of high specific radioactivity, Biochem. J, 89, 114—123, 1963.

[5] International Atomic Energy Agency, Vienna, Laboratory training Manual on the Use of Isotopes and Radiation in Animal Research, 134—139, 1966.

实验二十七　培养细胞的放射性核素标记及测定

一、实验目的

用放射性核素标记细胞成份是肿瘤、病毒、免疫学、细

胞生物学和分子生物学等研究领域不可缺少的一种手段，本实验在于掌握培养细胞的标记和测量方法。

二、基本原理

离体培养的细胞在生长、分裂和代谢过程中，需复制其DNA，转录RNA和合成各种必需的蛋白质，故需从其周围的培养液中吸取这些大分子物质的前体——核苷和氨基酸等，故可在培养液中加入有放射性标记的前体，以了解某种大分子物质的合成情况。

三、材料，仪器

^{3}H-TdR（氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷），离体培养的传代鸡胚细胞，199培养液，细胞培养箱，培养皿，培养瓶，倒置显微镜，离心机，小浴箱等。

四、实验步骤

1．用放射自显影法测量细胞的放射性

选取生长良好，长成单层的鸡胚细胞，吸出瓶中培养液，用汉氏液（或缺Ca^{2+}，Mg^{2+}汉氏液）洗一次，加入0.25％预温的胰酶（加入量以能盖满整个瓶底即可，一般2ml的培养瓶加1ml已足够），于37℃消化3min左右（或室温消化至细胞轻摇即可脱壁为止），每瓶加入1ml小牛血清（或加3ml汉氏液稀释）以中止胰酶消化。细胞通过离心、计数，最后用营养液把细胞稀释成适当浓度的悬液（5×10^5细胞/ml左右），分装入无菌的底部已垫有盖玻片的小培养皿中，在37℃培养过夜（若无CO_2培养箱，应设法把培养皿密封）。

第二天吸除营养液，于每一皿中加入预温至37℃的含 ^{3}H-TdR（3.7—7.4）×10^{4} Bq/ml）的营养液，放回37℃培养箱中同样培养。

按不同时间定期取样，每次至少取出二片盖玻片，分别用汉氏液洗三次，迅速置入醋酸-甲醇（1:3）固定液中，固定20—30min，然后用一系列不同浓度酒精脱水，至95%酒精后取出晾干，用少量优质中性树脂把盖玻片背面（无细胞一面）贴在干净的载玻片上，树脂用量以不溢出盖片周边为宜，并避免产生气泡，然后放置无尘处使树脂干燥。小心不要触及盖玻片表面，以免细胞破坏或抹掉。

以下步骤：涂乳胶、显影、染色和封片的方法可参考本书有关部分。鸡胚细胞可用苏木精-伊红染色，或单用吉姆萨染色亦可。

2. 用液闪计数法测量细胞的放射性

取如前细胞悬液分装入25ml培养瓶中（每瓶3—5ml细胞悬液），等细胞贴壁后，如前用同位素标记，定期取样，每次取二个平行样品（即两瓶细胞）。

取出的样品弃去培养液，用汉氏液充分洗净细胞层表面沾染的放射性，然后加入1ml的溶胞液，使细胞脱壁溶解，溶解后再加入4ml10%冷三氯乙酸（TCA），使产生沉淀。然后分别用玻璃纤维滤膜抽滤，滤好后用大头针插在海绵板上（做好记号），全部处理完毕后用红外线灯烘干，分别置液闪计数瓶中，加入5—10ml闪烁液，于液闪计数器上计数。

五、结果与分析

在显微镜下观察制好的玻片标本，可见细胞核中有黑色

的银粒，颗粒的疏密可以定量地表示放射性的程度。

根据液闪测量的cpm 数，可以看出放射性同位素标记不同时间后，细胞中 DNA 的合成情况，可以画出 DNA 合成的曲线图。

六、主要参考资料

[1] 鄂征主编，组织培养技术，204—207人，人民卫生出版社，1982.

附录：溶液配制

1. 汉氏（Hanks）液的配制

氯化钠（NaCl）8.00g

氯化钾（KCl）0.40g

磷酸氢二钠（$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$）0.06g

磷酸氢二钾（K_2HPO_4）0.06g

硫酸镁（$MgSO_4 \cdot 7H_2O$）0.20g

葡萄糖 1.00g

氯化钙（$CaCl_2$）0.14g

双蒸水（或去离子水）加至1000ml

在配制汉氏液时，应将 $CaCl_2$ 先用一小烧杯盛放，加入约50ml 水（双蒸或去离子水），置 4℃冰箱中溶解，然后按配方顺序把药品逐一溶解于另一大烧杯中。只有前一种药品完全溶解之后，才能加入下一种药品，否则会产生沉淀。全部药品溶解完后，最后把已溶的 $CaCl_2$ 慢慢倒入，不断摇动使混匀，加1%酚红1.6ml，再加双蒸水至 1000ml，8 磅高压蒸气消毒 20min，放 4℃贮存，使用前1000ml中加1.4%碳酸氢钠25ml。

按上述方法也可配制成10倍浓缩的贮存液，在贮存液内

加2ml氯仿防腐，用时按比例稀释，滤纸过滤，分装于瓶中，8磅20min高压灭菌，取出后在无菌箱中换上翻口橡皮塞，置冰箱中贮存。

（注意：高压灭菌会丢失一定的水分，可用划线的方法在冷却后补足失去的水分。）

2. 胰酶（0.25%）

胰酶2.5g

汉氏液1000ml

用少量汉氏液先把胰酶粉末调成糊状，补足汉氏液，振摇混匀，置4℃冰箱内过夜。次日胰酶溶解后用滤纸过滤。滤液再经微孔滤膜或玻璃滤器滤过除菌，分装入小瓶，低温冰箱或普通冰箱冰冻保存。使用时用$NaHCO_3$调节pH至7.0左右。

3. 199营养液

取199干粉（日本制药株式会社产品）9.8g，加双蒸水至1000ml，完全溶解后加压过滤，分装冻存，用时加$NaHCO_3$调pH至7.2左右（每100ml溶液约加7.5%$NaHCO_3$1.4ml）。

4. 碳酸氢钠溶液

	1.4%	4.4%	7.5%
碳酸氢钠	1.4g	4.4g	7.5g
双蒸水	100m	100ml	100ml

在双蒸水中溶解碳酸氢钠，加压过滤除菌，分装，堵紧瓶塞，4℃贮存，每瓶最好一次用光。

5. 溶胞液

于100ml蒸馏水中加入1gSDS，溶解后加1ml巯基乙醇即成。

实验二十八　放射免疫分析法
——抗血清（抗体）稀释液的选择与标准曲线的测定

一、实验目的

1.掌握放射对流免疫电泳法的基本操作；

2.学习抗血清（抗体）稀释曲线和AFP标准曲线的测定。

二、基本原理

本实验是用放射对流免疫电泳法测定甲胎蛋白（AFP）。其原理是：在电场条件下，等电点为4.75的抗原AFP在PH8.6缓冲液中带负电，而由阴极向阳极移动。等电点为6.85—7.3的抗体（抗AFP血清）在PH8.6缓冲液中虽然也带负电，但与抗原AFP相比，数量少得多，因此移动速度较抗原慢。又因抗体（抗AFP血清）的电渗作用超过了电泳作用，而使抗体向阳极移动，这样，只要把抗原放在阴极一端，抗体放在阳极一端，通电后，抗原与抗体相遇后，就会结合形成抗原-抗体复合物在电场中不移动，形成白色的免疫沉淀带。而游离的抗原在电场中继续移动，而与抗原-抗体复合物分离。分别测定结合部分与游离部分的放射性强度。即可计算出标记抗原与抗体的结合率、其计算公式如下。

$$结合率=\frac{B}{B+F}\times 100\%$$

三、材料，仪器

0.05M pH8.6巴比妥钠-盐酸缓冲液，1%琼脂糖，0.1%溴酚兰指示剂，^{125}I-AFP（甲胎蛋白），AFP标准液，抗AFP血清一系列稀释液，正常人血清；

电泳仪与电泳槽，微量加样器，γ免疫计数器。

四、实验步骤

1.琼脂糖板的制备

琼脂糖浓度为1—1.5%、用0.05M pH8.6巴比妥钠-盐酸溶液加热溶解，然后在特制的有机玻璃框架(如图18-1)，倒入琼脂糖90—100ml，约30min后，琼脂糖凝固、取出打孔模和框架前后的粘合纸，小心地把有机玻璃架平放在电泳槽内，如下图，左侧为抗原孔，右侧为抗体孔；两孔之间相距—cm。

2.电泳条件

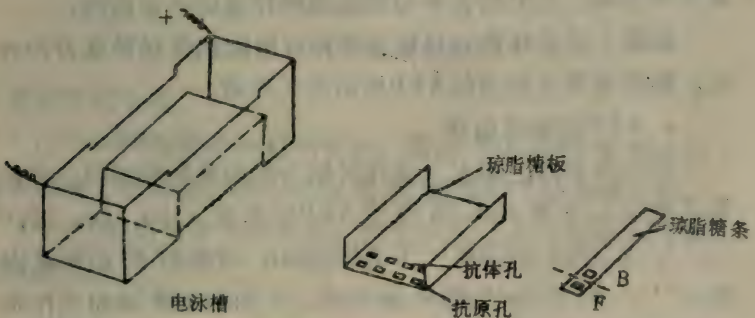


图28-1　琼脂糖板及琼脂糖条计数示意图

以0.05M pH8.6巴比妥钠-盐酸缓冲液为导电介质，每块琼脂板电压为80—100V，电流为50mA，电泳时间3—4 h。

3.AFP抗血清（抗体）稀释曲线

在抗体孔内，分别加入20ml不同稀释度（500、1000、2000、4000、8000、16000倍）的抗AFP血清。在抗原孔内加入20μl ^{125}I-AFP（含2000—4000cpm）。对照组的抗体孔内以稀释液代替AFP抗血清，抗原孔内除加^{125}I-AFP外，另加一小滴溴酚兰作指示剂。

琼脂糖板有孔的一端接电源负极，另一端接正极，通电约4 h后，可见抗原孔内溴酚兰指示剂已移到琼脂糖板正极一边的位置，这时表示与抗体结合后，剩余的游离抗原已泳动至琼脂糖板的另一端，停止电泳。依号数将各琼脂糖条切下，并按图18-1虚线处把B和F分开，放入测量管内。在γ免疫计数器上测定B（抗原-抗体复合物）与F（游离抗原）的放射性强度。再计算出各自的结合率。

以不同稀释度的抗血清为横坐标，^{125}I-AFP的结合率为纵坐标，绘出结合率与抗血清稀释度的关系曲线。

根据上述曲线选50%结合率相对应的抗体稀释度为2000倍，则此稀释度即为抗AFP血清的工作液。

4.AFP的标准曲线

在抗体孔内，加入上述50%结合率的稀释液20μl，在抗原孔内加入一系列不同浓度AFP标准液（100，50，25，10，5，2.5ng）20μl和^{125}I-AFP20μl，对照组的抗原孔内加入^{125}I-AFP20μl和稀释液20μl，外加一小滴溴酚兰作指示剂，对照组的抗体孔内加入20μl稀释液，按前面所述方法电泳3—4 h后，切出B和F部分，再测定其放射性活度，计算

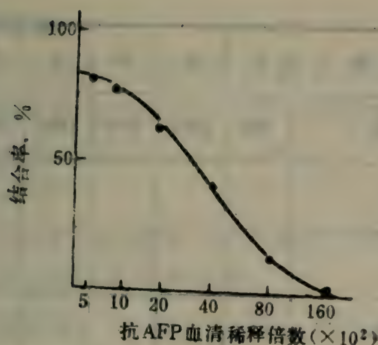


图28-2　抗血清稀释曲线

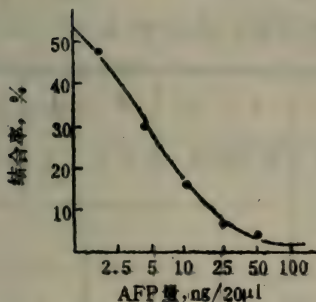


图28-3　AFP的标准曲线

出各点的结合率。

由于AFP的量有一系列变化，因此^{125}I-AFP与抗体结合率也随之而改变。以不同浓度的标准AFP量为横坐标，^{125}I-AFP的结合率为纵坐标，在坐标纸上绘出标准AFP的标准曲线。

五、结果与分析

1.有关数据填入下表

孔　号	1	2	3	4	5	6	7
抗体稀释倍数	500	1000	2000	4000	8000	16000	对照
B cpm							
F cpm							
B/B+F·%							

2.根据上述数据，请绘出AFP抗血清稀释曲线。

3.有关数据填入下表

孔　号	1	2	3	4	5	6	7
20μlAFPng数							
B cpm							
F cpm							
B/B+F·%							

4.根据上表数据、请绘出AFP的标准曲线。

六、主要参考资料

[1] 上海生化所等，人及大白鼠甲胎蛋白放射对流免疫电泳的定量测定，79—83页，放射免疫分析及其它放射体外测定方法，原子能出版社，1976。

[2] 曾庆镒，李瑞华，快速放射免疫定量技术，生物化学与生物物理学报，第13卷，第4期，359—362页，1981。

附：试剂配制：

(1)0.05M pH8.6巴比妥钠-盐酸缓冲液，巴比妥钠 10.31g加水至1000ml，和0.06ml的12N HCl混匀。

(2)0.1%溴酚兰指示剂。

(3)^{125}I-AFP

20μl^{125}I-AFP，有2000—4000脉冲/min即可。

(4)抗AFP血清一系列稀释液：

20μl不同稀释度，分别含有500，1000，2000，4000，8000，16000倍的抗AFP血清。

(5)AFP标准液：

20μl一系列不同浓度的AFP，分别含有2.5，5，10，25，50，100ngAFP。

(6)样品稀释液：

0.05M pH8.6巴比妥钠-盐酸缓冲液加入1:20的正常人混合血清。

实验二十九　放射性纸上层析法

一、实验目的

掌握应用纸层析法分离提纯放射性物质组分的基本操作方法。

二、基本原理

纸上层析法是用层析滤纸作为支持体，纸上吸附的水分作为固定相，用与水不相混合的溶剂作为流动相，从纸上流

过以进行分配层析。这样借助于被分离物在互不相溶的两相溶剂的分配系数不同而达到分离提纯的目的。在实际应用中也常用和水相混合的溶剂作为流动相，与纸上吸附的水分仍然形成类似不相混合的二相中进行分配层析。

在纸上层析中，经常采用R_f值，以下式来表示。

$$R_f = \frac{\text{溶质中心移动的距离}}{\text{溶剂前缘移动的距离}}$$

R_f值与被分离物质 性 质（分配系数）及进行层析时的条件有关。

由于溶质具有放射性，所以通过放射性测量，最后可确定溶质在纸上移动的距离，计算出R_f值的数据。

三、材料，仪器

1.甲苯闪烁液：

PPO（2.5-二苯基噁唑）5g，

无水乙醇　　　　300ml，

甲苯至　　　　1000ml。

2.展开剂

(1)正丁醇：吡啶：水＝10：3：3

(2)正丁醇：乙醇：水＝50：32：18

把上述溶剂按比例注入试剂瓶，摇动数分钟，得到的液体作展开剂。

3.试样（超过有效期^{14}C-葡萄糖）；

4.标准^{14}C-葡萄糖；

5.新华一号滤纸；

6.液体闪烁计数器；

7.层析缸；
8.吹风机；
9.毛细管。

四、实验步骤

1.点样：取新华滤纸截成20×18cm一张，在距离一端2cm的地方，用铅笔轻轻划一横线，并在线上每隔2cm处点上黑点，并标上记号。用毛细管取试样，溶液滴于左边黑点上，吹干；再点，再吹干，重复3—5次，或进行定量滴样。^{14}C-葡萄糖则滴于右侧黑点上，操作和试样相同。

2.展层：展层方法用上行法，把已配好的展开溶剂约5 ml倒入培养皿内，然后把培养皿放入层析缸内，将已点好样的滤纸用线缝接口处使连成圆筒状。两滤纸间应留空隙。然后把滤纸筒垂直放入培养皿内，滤纸筒底部浸入展开溶剂中约1cm处。并开始记录上升时间。层析经过4h后，取出滤纸，用铅笔划上溶剂前缘上升的距离，晾干。

3.测定：在^{14}C-葡萄糖和试样的位置，从原点到前沿，每隔1cm为一段，编上号数。把每一小段用剪刀剪下后放入甲苯闪烁液中湿润后，马上放入闪烁瓶内，在液体闪烁计数器中测定放射性强度。

五、结果与分析

截距，cm / 样品	0	1	2	3	4	……
^{14}C-葡萄糖，cpm						
试样，cpm						

1.把 ^{14}C-葡萄糖和试样的放射性测定结果填入上表。

O——甲苯闪烁液本底。

2.求出 ^{14}C-葡萄糖的 R_f 值。

3.根据 ^{14}C-葡萄糖的 R_f 值，把试样位置上的 ^{14}C-葡萄糖剪下，用蒸馏水洗脱，洗液即为分离了的 ^{14}C-葡萄糖。

六、主要参考资料

[1] 潘家秀等编，蛋白质化学研究技术、35页，科学出版社，1962。

[2] 沙速茂等编，用纸上色层法分离放射性铈、钷、镧和钇，原子能科学技术，5期，第568页，原子能出版社，1981。

[3] 林启寿著，纸上色谱及其在中草药成分分析中应用，31—55，科学出版社，1983。

实验三十 放射自显影I——宏观放射自显影技术

一、实验目的

掌握宏观自显影的基本技术。

二、基本原理

放射自显影是利用样品中示踪物质所放出的射线作用于照相底片（X光软片或幻灯正片），使底片产生潜影，经显影后把相现出来，从底片中的黑度而得知样品中欲测成分的分布与积累情况。

三、材料与仪器

X光软片，米吐尔，无水亚硫酸钠，对苯二酚，无水碳

酸钠，溴化钾，醋酸，硼酸，硫酸铝钾，硫代硫酸钠，^{32}P（$NaH_2^{32}PO_4$）。

X光暗合。

四、实验步骤

1.标记：拔取中草药车前草幼苗，将根系洗干净，浸入含^{32}P（$NaH_2^{32}PO_4$）放射性比度为9.25×10^3Bq/ml的Knop培养液中培养8—16h，取出后用自来水冲洗根系，至溶液中放射性接近本底为止。

2.制作标本：在洁净的草纸上整形，剪去重叠的枝叶，将标本夹于两层草纸之间，再用标本夹夹好放在干燥箱中，60℃下干燥两天。剪下的枝叶也做同样处理，留作实验曝光用。

3.上X光软片：在暗室弱的红灯（经检查为安全的）下距离50cm处将干标本与X光软片接触，软片与标本之间放一张薄纸做保护层，装进X光暗盒。

4.曝光：将暗盒置于20℃左右的地方曝光，对β射线来说，每平方厘米500—1000万粒子左右，以此来估算样品的曝光时间，或每隔一天将剪下的枝叶所做的自显影底片，进行显影，决定合适的曝光时间。

5.显影：将底片置于20℃的显影液中显影1—3min，后转入停影液中10s，再转入酸性坚膜定影液中15—20min，取出后在自来水中冲洗20min。

6.观察：阴干后用肉眼或放大镜观察，注意自显影图相与植物标本结构的关系。

五、结果和分析

底片中黑度的深浅反映出放射性积累的多或少。从样品在底片中的黑度，说明放射性物质在植物器官中的分布情况，并对根、叶、花中放射性物质积累情况作分析比较。

六、主要参考资料

[1] 刘振声、傅家瑞，^{14}C标记B，在花生中的运转与积累的研究，植物学报，23（2）：116—121，1981。

[2] 陈子元等主编，核技术及其在农业科学中的应用，169—170，科学出版社，1983。

[3] Boyd, G. A. Autoradiography in Biology and medicine, 1965.

附：溶液配制

1.显影液：取蒸馏水750ml，加热保持在50℃以下，按下列顺序，数量逐一加入药品（必须待第一种药品全溶后，再加入第二种）。

米吐尔	3.5g
无水亚硫酸钠	60g
对苯二酚	8g
无水碳酸钠	40g
溴化钾	3.5g
加蒸馏水至	1000ml

2.停影液

蒸馏水	990ml
冰醋酸	10ml

3.酸性坚膜定影液

甲液贮藏液：

蒸馏水（50℃）	150ml
无水亚硫酸钠	19g
醋酸（28%）	60ml
硼酸	9.6ml
硫酸铝钾	19g
加水至总量	250ml

乙液贮藏液：

硫代硫酸钠	300g
加水至总量	1000ml

用时取甲液 1 份加乙液 4 份混和。

实验三十一 放射自显影II——组织（细胞）放射自显影技术

一、实验目的

掌握组织（细胞）放射自显影的基本技术。

二、基本原理

组织放射自显影是利用样品中示踪物质所放出的射线作用于核子乳胶，使乳胶层产生潜影，经显影把相现出来。从乳胶片中银颗粒数的多少而得知样品中欲测物质的分布与积累情况。

三、材料，仪器

实验材料：小白鼠，花生胚根。核-4乳胶，无水亚硫酸

钠，对苯二酚，米吐尔，无水碳酸钠，溴化钾，冰醋酸，硫代硫酸钠，硫酸铝钾，硅胶，^{14}C-甘氨酸，^{3}H-胸腺嘧啶核苷。

恒温水浴，塑料暗盒，电冰箱。

四、实验步骤

1.材料及标记：

(1)动物材料：小白鼠一只皮下注射^{14}C-甘氨酸，每克体重3.7×10^{4}Bq，5h后杀死，取出肝组织，在10%甲醛液中固定2h，水洗1h。

(2)植物材料：取花生胚根若干个，浸在^{3}H-胸腺嘧啶核苷中标记2h（放射性比度1.85×10^{6}Bq/ml），取出样品，用自来水冲洗干净胚根表面的放射性，放入培养皿中培养若干小时，后将胚根于Carnoy固定液(无水乙醇：冰醋酸＝3：1)固定2h。

2.脱水包埋：植物样品在75%乙醇中洗三次，每次15min，(动物样品从30%乙醇开始脱水)，85%乙醇、95%乙醇、100%乙醇I、II各15min，$\frac{1}{2}$无水乙醇＋$\frac{1}{2}$二甲苯20min，二甲苯I，II各15 min，$\frac{1}{2}$二甲苯＋$\frac{1}{2}$石蜡5h，纯石蜡I、II各8h，石蜡包埋。

3.切片：用手摇切片机切片，厚度8μm，二甲苯脱蜡I、II各20min。

4.上保护层：有样品的载玻片浸入0.5%的火棉胶中，提起后擦去背面的火棉胶，凉干。

5.涂布核子乳胶：在暗室内弱红灯下，室温保持在25℃左右，湿度>80%。根据需要量取出核-4乳胶（北京401所生产），用双蒸水稀释一倍，在40℃恒温水浴中溶化10 min，用干净的胶头吸管吸一滴乳胶于载玻片远离样品的一端，用小玻棒将乳胶轻轻均匀地往另一边拉，擦去一端多余的乳胶，凉干后装进暗盒。

6.曝光：将暗盒装进有硅胶的塑料袋中，放入冰箱4℃下曝光20天左右，每隔若干天拿出一片进行显影，检查是否曝光充分。

7.显影：在D_{19}显影液中，温度20℃，显影3min。停影液中停影10s。定影液中定影10—15min，蒸馏水洗5次。

8.染色封片：植物样品用1%番红染色，动物样品用伊红-苏木精染色。经脱水透明后，用光学树脂胶封片。

9.观察：用显微镜观察细胞内银颗粒分布情况。

五、结果与分析

计算在组织同一部位同一视野下，^{3}H-胸腺嘧啶核苷进入细胞核的数量及细胞的标记率。从而了解DNA合成情况（因^{3}H-胸腺嘧啶是DNA的前体）。了解^{14}C-甘氨酸在小白鼠肝细胞的分布情况。

六、主要参考资料

[1] 生物学中的放射自显影术（译文集），科学出版社，1963。

[2] 刘振声，利用显微放射自显影技术研究B_9对花生胚根核酸和蛋白质合成的影响，中山大学学报（自然科学版），1：133—136，1984。

[3] Rogers, A. W., Techniques of autoradiography, 3nd Ed., Amsterdam, Elsavier, 1979.

附：溶液配制

1.D_{19}显影液

米吐尔	2g
无水亚硫酸钠	75g
对苯二酚	8g
无水碳酸钠	37.5
溴化钾	10g
蒸馏水加至	1000ml

2.停显影

冰醋酸	10ml
蒸馏水	990ml

3.酸性坚膜定影液

溶液(1)：

蒸馏水 (50℃)	500ml
硫代硫酸钠	240g

溶液(2)：

蒸馏水	150ml
无水亚硫酸钠	15g
28%醋酸	45ml
硫酸铝钾	15ml

(2)加入(1)中再加蒸馏水至总量为1000ml。

实验三十二 放射自显影

III——高速放射自显影技术

一、实验目的

掌握高速放射自显影技术的基本方法。

二、基本原理

高速放射自显影技术是在普通常规微观自显影的乳胶层上涂一层荧光剂（如液体闪烁剂 PPO、POPOP、有机溶剂及其他荧光物质，从而使所涂乳胶层一方面直接接受标本中放射线的作用，一方面又接受穿过乳胶层的放射线激发荧光剂而产生的光子的作用，由于乳胶层接受双重作用，效率大为提高，所以缩短了曝光时间（由数日或十数日缩短为3—4 h），得到像常规微观自显影一样的良好效果。

三、材料，仪器

实验材料：花生胚根，^{3}H-胸腺嘧啶核苷，PPO，POPOP，苯，二氧六环，米吐尔，对苯二酚，无水硫酸钠，无水碳酸钠，溴化钾，硫代硫酸钠，冰醋酸，硫酸铝钾，核-4乳胶，乙醇；

恒温水浴，染色缸，冰箱。

四、实验步骤

步骤1—4与放射自显影II的实验步骤相同，只是实验材料用^{3}H-胸腺嘧啶核苷标记的花生根尖。

5.将涂布了核子乳胶干燥后的载玻片三组各两片，分别在闪烁液I、II、III中（配方见附录）浸泡1min。

6.将载玻片放入直立的染色缸中，缸底加入少许同种闪烁液，盖好染色缸盖，外用两层黑纸包好。

7.曝光：将染色缸放进冰箱中，4℃下曝光4h。

8.曝光完毕后在暗室弱红光灯下用纯酒精洗涤载玻片2min。

9.显影：在D_{19}显影液（配方见放射自显影II附录）20℃下显影3分钟，酸性坚膜定影液中定影10—15min。

10.冲洗：用蒸馏水洗5次。

11.染色：用1%番红染色2h。

12.脱水：蒸馏水洗去载玻片表面的染料，再用系列乙醇脱水；30%，50%，75%，85%，95%，100%I、II乙醇各15min。

13.透明：$\frac{1}{2}$100%乙醇＋$\frac{1}{2}$二甲苯15min，二甲苯I、II各20min。

14.封片：用加拿大胶或光学树脂胶封片。

15.观察：在光学显微镜下观察，计算在一定范围和位置下^{3}H-胸腺嘧啶核苷进入的细胞核数和银颗粒数。

五、结果与分析

1.将观察结果列入下表

2.比较分析不同闪烁液的效果。

观察视野编号	每个视野的总细胞数	^{3}H-TdR进入的细胞核数	标记率（%）

六、主要参考资料

[1] 刘鼎新，放射自显影术的一些新进展，核医学进展，1，1980.

[2] Panayi, G. S., Neill, W. A., J. Immunal, Methods, 2：15, 1972.

[3] Sawicki, W. et al., Histochemistry, 52: 341, 1977.

附：闪烁液配制

1. PPO-POPOP二氧六环闪烁液

PPO	5g
POPOP	0.4g
萘	110g
二氧六环加至	1000ml

2. PPO-二氧六环闪烁液

PPO	7g
萘	100g
二氧六环加至	1000ml

3. POPOP-二氧六环闪烁液

POPOP	0.8g
萘	110g
二氧六环加至	1000ml

核技术在生物学中

借者	还期	借者	还期
89. 1989.3.24			
90.2.03			

注 意

1 借书到期请即送还。

2 请勿在书上批改圈点，折角。

3 借去图书如有污损遗失等情形须照章赔偿。

封面设计：冯 永 路

统一书号：15175·901　定价：1.30元

ISBN 7-5022-0047-9/TL·17